

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Πτυχιακή διατριβή

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ
ΒΙΟΔΙΑΣΠΟΥΝ ΤΗΝ ΝΙΤΡΟΦΑΙΝΟΛΗ.

Καλλιόπη Τσαγγαρίδου

Λεμεσός 2013

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Πτυχιακή διατριβή

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ
ΒΙΟΔΙΑΣΠΟΥΝ ΤΗΝ ΝΙΤΡΟΦΑΙΝΟΛΗ.

Καλλιόπη Τσαγγαρίδου

Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Ιωάννης Βυρίδης

Λεμεσός 2013

Πνευματικά Δικαιώματα

Copyright © Τσαγγαρίδου Καλλιόπη, 2013

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής διατριβής από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστήμιου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέλαβαν στη διεκπεραίωση της.

Τις πιο θερμές μου ευχαριστίες, οφείλω να τις εκφράσω στον επιβλέπων Καθηγητή Δρ. Ιωάννη Βυρίδη, ο οποίος μου έδειξε την απαραίτητη εμπιστοσύνη και μου έδωσε την δυνατότητα να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο συγκεκριμένο επιστημονικό τομέα.

Οφείλω να τον ευχαριστήσω επίσης, για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια της εργασίας μου καθώς και για την υποστήριξη και καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την ολοκλήρωση των σπουδών μου. Η συνεργασία μαζί του υπήρξε μοναδική διδακτική εμπειρία σε ένα φιλικό και γεμάτο θετική ενέργεια κλίμα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην μεταπτυχιακό φοιτήτρια Ελένη Ξενοφώντος, για την απλόχερη βοήθεια της κατά την εκπόνηση του εργαστηριακού κομματιού της πτυχιακής μου, αφού χωρίς αυτήν η ολοκλήρωση της μελέτης θα ήταν πολύ δύσκολη. Η καθοδήγηση της και οι υποδείξεις της, καθώς και η συμπαράσταση της και η προθυμία της ήταν καθοριστικά για την ολοκλήρωση και συγγραφή της εργασίας. Οι ατέλειωτες ώρες στα εργαστήρια, με την βοήθεια της πέρασαν ευχάριστα και οδήγησαν στην διεκπεραίωση της εργασίας όσο πιο ομαλά γινόταν.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην συμφοιτήτρια μου, Γεωργία Νικολάου για την αμέριστη βοήθειά της και την υπομονή που επέδειξε μαζί μου κατά την εκτέλεση και συγγραφή της μελέτης.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, για την συμπαράσταση και την κατανόηση της καθ' όλη την διάρκεια της πτυχιακής μου διατριβής και για όλα όσα έχει κάνει για μένα σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	-2-
1.....	Ε
ΙΣΑΓΩΓΗ	-4-
2.....	Θ
ΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ	-6-
2.1.....	4-
Νιτροφαινόλη	-6-
2.2.....	Μ
ικροοργανισμοί.....	-9-
2.3.....	Μ
ικροβιολογικές μέθοδοι και αναλυτικές τεχνικές.....	-10-
2.3.1	Θ
ρεπτικό Υπόστρωμα.....	-10-
2.3.2	Α
ποστείρωση.....	-11-
2.3.3	Α
γαρ	-12-
2.3.4	Ε
νδυνάμωση δειγμάτων.....	-12-
2.3.5	Α
πομόνωση μικροοργανισμών	-12-
2.3.6	Δ
ημιουργία καθαρής υγρής καλλιέργειας.....	-13-
2.3.7	Φ
ασματοφωτομετρία.....	-13-
2.3.8	Ε
ξαγωγή DNA	-14-

2.3.9	H
λεκτροφόρηση	-15-
2.3.10	A
λυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	-15-
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	-18-
3.1 4-Νιτροφαινόλη	-18-
3.1.1 Ενδυνάμωση δειγμάτων	-18-
3.1.2 Εμβολιασμός σε τρυβλία	-19-
3.1.3 Δημιουργία καθαρής καλλιέργειας αποικίας σε τρυβλία	-21-
3.1.4 Δημιουργία υγρής καθαρής καλλιέργειας.....	-22-
3.1.5 Αποθήκευση μικροοργανισμών	-23-
3.1.6 Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας.....	-23-
3.1.7 Εξαγωγή DNA	-24-
3.1.8 Ηλεκτροφόρηση.....	-25-
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	-27-
4.1 4- Νιτροφαινόλη	-26-
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	-35-
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	-36-

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ευρεία χρήση νιτροαρωματικών, ως συνθετικά ενδιάμεσα για την παρασκευή φαρμακευτικών προϊόντων, χρωστικών, βαφών, πλαστικών, φυτοφαρμάκων και μυκητοκτόνων, εκρηκτικών υλών και βιομηχανικών διαλυτών, οδηγούν σε συσσώρευση της νιτροφαινόλης. Η π-νιτροφαινόλη είναι η πιο σημαντική από τα μονό-νιτροφαινόλς, όσων αφορά τις ποσότητες που χρησιμοποιούνται και την δυνατότητα μόλυνσης του περιβάλλοντος και μια από τις πιο σημαντικές φαινόλες. Η π-νιτροφαινόλη είναι υδροδιαλυτή, οπότε το κύριο εμπόδιο για την υποβάθμιση της είναι η τοξικότητά της. [1][2]

Είναι γνωστό ότι η π-νιτροφαινόλη και συγκεκριμένα η 4-νιτροφαινόλη, είναι ιδιαίτερα τοξική για τους περισσότερους μικροοργανισμούς και ότι η τοξικότητα της σε υψηλές συγκεντρώσεις περιορίζει την υποβάθμιση της. Η 4-νιτροφαινόλη έχει ταξινομηθεί ως ρύπος προτεραιότητας από την Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών και συνιστά περιορισμό της σε συγκεντρώσεις στα φυσικά ύδατα < 10 ng/l. Ως εκ τούτου η 4-νιτροφαινόλη δημιουργεί σημαντικά για την υγεία και για το περιβάλλον προβλήματα, επειδή είναι τοξική για πολλούς οργανισμούς και μπορεί να συσσωρευέτε στην τροφική αλυσίδα.[1][2]

Ως αποτέλεσμα της αυξημένης ευαισθητοποίησης για την ρύπανση που προκαλείται από την απελευθέρωση της π-νιτροφαινόλης, γίνονται προσπάθειες για την ελαχιστοποίηση των αρνητικών επιπτώσεων της. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται μικροβιακά συστήματα και προγράμματα βιοαποκατάστασης στην θέση άλλων παραδοσιακών μεθόδων, όπως η υγειονομική ταφή, αποτέφρωση, εκσκαφές, κλπ. για την εξυγίανση των μολυσμένων εδαφών και υδάτων. [1][3]

Στόχος αυτής της εργασίας είναι η εύρεση και η απομόνωση μικροοργανισμών που βιοαποικοδομούν την νιτροφαινόλη, καθώς επίσης και η ταυτοποίηση τους. Απώτερος σκοπός της μελέτης είναι η χρήση αυτών των μικροοργανισμών σαν ομάδα για την επεξεργασία των βιομηχανικών λυμάτων αλλά και η χρήση τους σε άλλες ομάδες για την επεξεργασία άλλων εκροών αποβλήτων που έχουν κοινά συστατικά με τα βιομηχανικά λύματα.

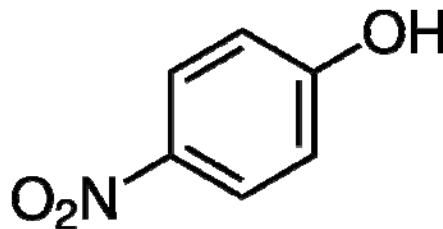
Για την διεκπεραίωση της έρευνας χρησιμοποιήθηκαν οι πιο κάτω μικροβιολογικές μέθοδοι και τεχνικές ανάλυσης:

- Ενδυνάμωση δειγμάτων
- Εμβολιασμός σε τρυβλία
- Δημιουργία καθαρής καλλιέργειας αποικίας σε τρυβλία
- Δημιουργία καθαρής υγρής καλλιέργειας
- Απομόνωση μ/ο
- Φασματοσκοπία UV-Vis
- Υγρή χρωματογραφία HPLC
- Μέθοδος εξαγωγής DNA
- Ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

2.1 4-νιτροφαινόλη

Οι ενώσεις φαινόλων, παράγονται ευρέως σε βιομηχανίες, υπάρχουν σε αφθονία στο περιβάλλον και μπορούν να ανιχνευτούν σε λύματα, σε ποτάμια και στο έδαφος. Η παρουσία των φαινόλων σε ομάδες νιτροφαινόλων και χλωρο-φαινόλων, αυξάνει τις τοξικές επιδράσεις τους προς το περιβάλλον και την υγεία του ανθρώπου.[4]



Εικόνα 2.1: Δομή Νιτροφαινόλης

Η π-νιτροφαινόλη και συγκεκριμένα η 4-νιτροφαινόλη είναι μια ένωση ξενοβιοτικού χαρακτήρα, εξαιρετικά τοξική για ορισμένους μικροοργανισμούς, είναι μια άχρωμη ως ελαφρώς κίτρινη, κρυσταλλική ουσία, η οποία είναι αρκετά διαλυτή στο νερό. Περιλαμβάνεται στον κατάλογο προτεραιότητας ρύπων ως μια σημαντική τοξική ένωση, η οποία χρησιμοποιείται στην κατασκευή εκρηκτικών, ναρκωτικών, βαφών, εντομοκτόνων και άλλα. Είναι



σταθερή στο περιβάλλον και διεισδύει εύκολα μέσω του εδάφους σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα. [4][5][6][7]

Εικόνα 2.2: Δείγμα από την νιτροφαινόλη.

Σύμφωνα με την οδηγία IPPC/2001, για την Ολοκληρωμένη Πρόληψη της Ρύπανσης, οι συγκεντρώσεις φαινόλων στις χημικές βιομηχανίες δεν πρέπει να ξεπερνούν το όριο των 61 mg/L. [4]

Η βιοαποικοδόμηση της 4-νιτροφαινόλης μπορεί να πραγματοποιηθεί σε αντιδραστήρα αλληλουχίας (SBR), είτε παρουσία ενός συν-υποστρώματος (πεπτόνη), είτε με την 4-νιτροφαινόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα. Η πιο πάνω διαδικασία με τον αντιδραστήρα SBR, ερευνήθηκε από τους Tomei και Annesini και τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ενθαρρυντικά αφού η απομάκρυνση της νιτροφαινόλης έφθασε στο 99% της αρχικής συγκέντρωσης. [4][7]

Η βιοαποικοδόμηση της 4-νιτροφαινόλης παρατηρήθηκε να συμβαίνει σε θερμοκρασίες από 15 έως 35 ° C και σε ένα ευρύ φάσμα του pH 5 έως 10, ενώ η μεγαλύτερη απελευθέρωση του νιτρώδους παρατηρήθηκε στους 30 ° C και το βέλτιστο pH για την υποβάθμιση της βρέθηκε να είναι σε αλκαλικά pH (pH 7-9). Σε θερμοκρασίες πάνω από 35 ° C ή κάτω από 20 ° C παρουσιάζονται δυσμενείς συνθήκες για την υποβάθμιση της 4-νιτροφαινόλης, όπως και σε pH μικρότερο του 6 ή μεγαλύτερο του 10. [2][3][5][6]

Οι φαινολικές ενώσεις, παράγονται ευρέως στην χημεία και υπάρχουν σε αφθονία στο περιβάλλον, έχουν ανιχνευθεί σε λύματα, σε ποτάμια και στο έδαφος. Η παρουσία υποκατεστημένων ομάδων σε φαινόλες (δηλαδή σε νίτρο και χλωρό-φαινόλες) αυξάνει τις τοξικές επιδράσεις στο περιβάλλον και στην ανθρώπινη υγεία.

Συνεχής ανάδευση με αντιδραστήρα CSTRs, συνήθως θεωρείται η καλύτερη λύση για απορρύπανση από εγκαταστάσεις επεξεργασίας βιομηχανικών λυμάτων δεδομένου ότι, σε σύγκριση με άλλη διαμόρφωση αντιδραστήρα, ο συγκεκριμένος λειτουργεί σε χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης υποστρώματος και συνεπώς, η τοξική επίδραση των ξενοβιοτικών ενώσεων μειώνει την δραστηριότητα της βιομάζας.

Από την άλλη πλευρά, είναι επίσης σημαντικό να επισημάνουμε ότι οι δυνατότητες της βιομάζας σε ενώσεις προσδιορίζονται από την επαγωγή της σύνθεσης των ενζύμων που είναι σε θέση να αναπτύξουν ειδικές μεταβολικές οδούς. Κατά συνέπεια, μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση για CSTR στη απορρύπανση μικτών ή βιομηχανικών λυμάτων είναι οι

ασυνεχείς αντιδραστήρες, όπως αλληλουχίας αντιδραστήρες (SBRs) οι οποίοι επιτρέπουν και δυναμικές συνθήκες και βέλτιστη συγκέντρωση υποστρώματος. Επιπλέον, αυτοί οι αντιδραστήρες χαρακτηρίζονται από ένα μεγάλο φάσμα συνθηκών λειτουργίας και μεγάλη ευελιξία λειτουργίας.

Η 4-νιτροφαινόλη είναι ένας τυπικός εκπρόσωπος των φαινολικών ενώσεων που περιλαμβάνονται στον κατάλογο προτεραιότητας ρύπων και ο οποίος των παραθέτει ως τοξικό ρύπο. Πηγές ρύπανσης που παρουσιάζονται από την 4-νιτροφαινόλη είναι στις βιομηχανικές δραστηριότητες (παρασκευή εκρηκτικών, φάρμακα, βαφές, φωσφόρο-οργανικά εντομοκτόνα, φυτοφάρμακα).

Επιπλέον, η 4-νιτροφαινόλη είναι ένας μείζων μεταβολίτης ούρων από παραθείο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης της έκθεσης του ανθρώπου σε αυτό το φυτοφάρμακο.

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εξερευνήθηκε ένα ευρύ φάσμα τιμών συγκέντρωσης 4-νιτροφαινόλης, το οποίο κυμαίνεται από πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις από 1-10 mg/L έως 500 mg/L. [5][7][8][9]

Πολλά στελέχη βακτηρίων μπορούν να χρησιμοποιήσουν την 4-νιτροφαινόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Μερικά από αυτά περιλαμβάνουν είδη *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter* και *Ochrobactrum sp. B2*. [2][7]

Στην συνέχεια, στον Πίνακα 2.1, παρουσιάζονται μερικά από τα είδη των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας για την 4-νιτροφαινόλη καθώς και κάποιες πληροφορίες για τον κάθε ένα από αυτούς, όπως φαίνονται από την βιβλιογραφική ανασκόπηση.

Πίνακας 2.1: Βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας για την νιτροφαινόλη.

Βακτήρια	T	pH	Εμπλουτισμός	HPLC	Ουσίες για περαιτέρω βιοαποκατάσταση	Υγρή καλλιέργεια	Συγκέντρωση
<i>Arthrobacter sp. HY2</i>	30°C	7-9	Με διαδοχική υπο-καλλιέργεια των δειγμάτων	Agilent Zorbax 300SB-C18	Γλυκόζη 0,1% B-κυκλοδεξτρίνη	Εργοστάσιο φυτοφαρμάκων	200 mg/L
<i>Ochrobactrum sp. B2</i>	30°C	7-10	Με διαδοχική υπο-καλλιέργεια των δειγμάτων	Agilent Zorbax 300SB-C18	Γλυκόζη 0,05% πεπτόνη, εκχύλισμα μαγιάς και η ουρία		150 mg/L
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , H S-D38	35°C	7		HPLC-DAD και LC-ESI/MS	χλωριούχου αμμωνίου 1%, 1% γλυκόζη	Εργοστάσιο φυτοφαρμάκων και ιατρικών φαρμάκων	200 mg/L

<i>Pseudomonas putida</i>	30°C	7-9				Βιομηχανία φυτοφαρμάκων	100 mg/L
<i>Rhodococcus sp. CN6</i>	35°C	6,5 - 9,5		Zorbax SB-C 18 στήλη	Δεξτρίνη, Νιτρική αμμωνία	Βιομηχανία φυτοφαρμάκων	100 mg/L

[2][3][8][9][10][11]

Στην συνέχεια αναφέρονται κάποιες από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την βιοαποικοδόμηση της νιτροφαινόλης, στις οποίες τις περισσότερες φορές χρησιμοποιείται η μέθοδος της φασματοφωτομετρίας και της HPLC.

- Μελέτη για τις επιπτώσεις της γλυκόζης και του αζώτου σε υποβάθμιση της π-νιτροφαινόλης από *P.putida* στα 300 mg/l.
- Μελέτη για τις επιπτώσεις διάφορων παραγόντων σχετικά με την υποβάθμιση της π-νιτροφαινόλης και την ανάπτυξη του *Ochrobactrum sp. B2*, σε υγρές καλλιέργειες για τον σχεδιασμό μιας αποτελεσματικής στρατηγικής αποκατάστασης.
- Μελέτη για κινητική βιοαποικοδόμησης 4-νιτροφαινόλης σε αναστολή βιομάζας αλληλουχίας αντιδραστήρα διαλείποντος έργου είτε με την παρουσία ενός συν-υποστρώματος ή με την εξυπηρέτηση 4-νιτροφαινόλης ως μόνη πηγή άνθρακα. (ανήκουν στα Betaproteobacteria).

2.2 Μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί είναι παντού, στον αέρα, στο έδαφος και στο νερό. Πάνω σε φυτά ή πέτρες ακόμη και στα πιο απίθανα μέρη. Τα βακτήρια είναι ζωντανοί οργανισμοί διαφόρων μεγεθών και σχημάτων. Συναντώνται κάτω από φυσιολογικές αλλά και ακραίες συνθήκες. Αναπαράγονται εύκολα και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ζωής στον πλανήτη και στην επιβίωση του ανθρώπου. Δομικά αποτελούνται από απλά οργανίδια με την γενετική πληροφορία να βρίσκεται στο χρωμόσωμα. Η γενετική πληροφορία μεταφέρεται μέσω του μηνύματος στο ριβόσωμα όπου συντίθενται κάτω από αυστηρό έλεγχο και ρυθμιστικές διαδικασίες οι πρωτεΐνες. Οι μικροοργανισμοί είναι πολύ μικρού μεγέθους με αποτέλεσμα να μην είναι ορατοί με γυμνό μάτι.

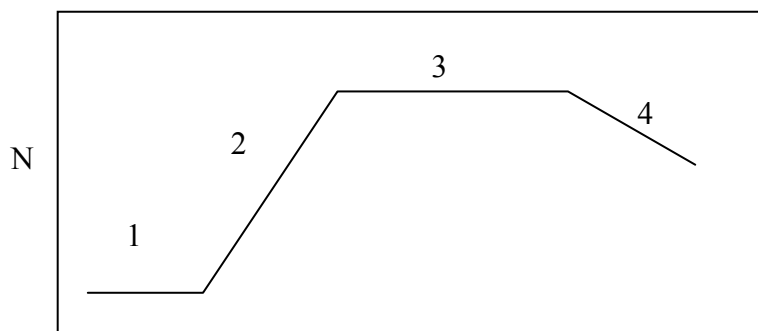
Παραδοσιακά οι ζωντανοί οργανισμοί χωρίζονται σε πέντε βασίλεια: Μονήρη – Πρώτιστα – Μύκητες – Φυτά – Ζώα. Αυτό το σύστημα όμως θεωρείται πλέον ξεπερασμένο από τους περισσότερους επιστήμονες. Σύμφωνα με τις σύγχρονες ταξινομικές μεθόδους, οι οποίες βασίζονται στην ακολουθία διαφόρων γονιδίων, οι οργανισμοί διακρίνονται σε τρεις επικράτειες:

- Αρχαία

- Βακτήρια
- Ευκάρυα

Υπάρχει επίσης μια σειρά από υποχρεωτικώς ενδοκυτταρικά παράσιτα, οι ιοί, που στην σειρά που παρατίθενται μπορούν να θεωρηθούν λιγότερο «ζωντανά». [12][13][14]

Όταν οι μικροοργανισμοί βρεθούν σε κατάλληλο υπόστρωμα και ιδανικές συνθήκες πολλαπλασιάζονται ταχύτατα. Η αναπαραγωγή διακρίνεται σε 4 φάσεις που φαίνονται στο παρακάτω σχήμα:



1. Το στάδιο προσαρμογής ή *φάση επώασης*: Δεν υπάρχει πολλαπλασιασμός, ενώ συντίθενται ένζυμα και νέο κυτταρόπλασμα.
2. Η *φάση επιτάχυνσης*: Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με μεγάλο και σταθερό ρυθμό. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα ο πληθυσμός των μικροβίων N διπλασιάζεται.
3. Η *φάση επιβράδυνσης*: Το θρεπτικό υλικό ελαττώνεται και οι μεταβολίτες των μικροβίων αυξάνονται, οπότε εξισώνεται η ανάπτυξη με το θάνατο των μικροβίων.
4. Η *φάση θανάτου* ή *παρακμής*: Ο αριθμός των κυττάρων που πεθαίνουν είναι μεγαλύτερος του αριθμού που παράγονται, οπότε επέρχεται μείωση του αριθμού των μικροβίων.

2.3 Μικροβιολογικές μέθοδοι και αναλυτικές τεχνικές

Για την απομόνωση, την ανάπτυξη και την μελέτη μικροοργανισμών, τους αναπτύσσουμε σε «καλλιέργειες». Μια καλλιέργεια μπορεί να αποτελείται από ένα ή και περισσότερα είδη μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης συνήθως κάτω από ειδικά ελεγχόμενες θερμοκρασίες. Μια καλλιέργεια που περιέχει μόνο ένα είδος μικροοργανισμού ονομάζεται καθαρή καλλιέργεια. Για την απομόνωση και την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε καθαρή καλλιέργεια, θα χρειαστεί κάποιος να προβεί σε ορισμένες τυποποιημένες διαδικασίες, μικροβιολογικές τεχνικές. Για την κατανόηση αυτών των τεχνικών πρέπει να αναφερθούν κάποιες βασικές έννοιες όπως το βιομέσο, το άγαρ κ.τ.λ.

2.3.1 Θρεπτικό υπόστρωμα (Βιομέσο)

Όπως όλοι οι οργανισμοί έτσι και οι μικροοργανισμοί χρειάζονται θρεπτικά συστατικά όπως άνθρακας, άζωτο, βιταμίνες και άλλους αυξητικούς παράγοντες για να επιζήσουν και να αναπτυχθούν. Τα συστατικά αυτά συνήθως προέρχονται από ενζυμική αποδόμηση άλλων περισσότερο σύνθετων ουσιών ζωικής και φυτικής προέλευσης. Η σύσταση των θρεπτικών συστατικών είναι αυτό που ονομάζεται θρεπτικό υπόστρωμα.[13]

Το υπόστρωμα μπορεί να είναι σε υγρή ή και στερεά μορφή. Στην υγρή μορφή στην συνήθως αναπτύσσουμε τους μικροοργανισμούς σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Μπορούν να προετοιμαστούν διάφοροι τύποι στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων εφόσον δεν υπάρχει ένα βιομέσο στο οποίο να αναπτύσσονται όλοι οι μικροοργανισμοί. Μετά την διάλυση των συνθετικών του θρεπτικού υποστρώματος ακολουθεί αποστείρωση. [12][13][14]

2.3.2 Αποστείρωση

Ο όρος αποστείρωση αναφέρεται στις διαδικασίες εκείνες που απαλλάσσουν αντικείμενα, υλικά ή χώρους από κάθε ζωντανό κύτταρο ή βιώσιμο σπόριο ή άλλη ανθεκτική μορφή ή ιό.. Η αποστείρωση είναι βασική προϋπόθεση εφαρμογής πολλών μικροβιολογικών τεχνικών και πραγματοποιείται με διάφορους τρόπους. Οι τρόποι αυτοί ομαδοποιούνται σε:

A. Φυσικές μέθοδοι

- i. Με θερμότητα: Είναι ο πιο αποτελεσματικός και ασφαλής τρόπος. Έχει το πλεονέκτημα ή μειονέκτημα της μη εκλεκτικότητας και της μεγάλης διεισδυτικότητας. Η αποστείρωση με θερμότητα μπορεί να επιτευχθεί είτε με ατμό είτε με ξηρή θερμότητα. Σε αυτή την πειραματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η αποστείρωση με ατμό.
- ii. Υπεριώδεις ακτίνες: Η μέγιστη αντιμικροβιακή δράση του υπεριώδους φωτός παρατηρείται στα 260nm. Στην ίδια περιοχή παρουσιάζει το μέγιστο σημείο απορρόφησης το DNA το οποίο θεωρείται και το σημείο δράσης του.
- iii. Ιονίζουσες ακτινοβολίες: Είναι οι ακτίνες γ, ακτίνες X και καθοδικές ακτίνες. Οι ακτίνες αυτές περιέχουν μεγαλύτερη ενέργεια και διαθέτουν μεγαλύτερη διεισδυτικότητα από τις υπεριώδεις.
- iv. Διήθηση: Στις περιπτώσεις των διαλυμάτων και ειδικότερα ασταθών στη θερμότητα ουσιών που πρέπει όμως να βρίσκονται σε διάλυση ή διήθηση αποτελεί την καλύτερη μέθοδο αποστείρωσης. Δυστυχώς με τη διήθηση δεν

B. Χημικές μέθοδοι

- i. Οξείδιο του αιθυλενίου: Είναι άχρωμο και υδατοδιάλυτο αλλά και ιδιαίτερα εκρηκτικό. Για το λόγο αυτό αραιώνεται με διοξείδιο του άνθρακα, άζωτο ή φθοριωμένους υδρογονάνθρακες. Χρησιμοποιείται για αποστείρωση ιατρικών εργαλείων, κλινοσκεπασμάτων και άλλων θερμοευαίσθητων υλικών. Επίσης χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Το οξείδιο του αιθυλενίου θεωρείται καρκινογόνο.
- ii. Φορμαλδεΰδη και γλουτεραλδεΰδη. [12][13][14][15]

2.3.3 Άγαρ

Το άγαρ είναι ένα πολυμερές της γαλακτόζης που εξάγεται από κυτταρικά τοιχώματα των φυκιών και συγκεκριμένα των κόκκινων φυκιών. Το άγαρ δεν έχει καμία θρεπτική αξία. Σε διάλυση η σκόνη άγαρ υγροποιείτε στους 100°C και στην συνέχεια στερεοποιείτε στους 40°C.

Το άγαρ έχει πολλά πλεονεκτήματα όπως:

1. Αποτελεί μια σκληρή επιφάνεια στην οποία οι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν ως μεμονωμένες αποικίες. Δηλαδή, ομάδες κυττάρων που προέρχονται από τον πολλαπλασιασμό από ένα μόνο κύτταρο ή σπόριο
2. Διάφορα είδη παράγουν συχνά μοναδικά χαρακτηριστικές αποικίες που μπορεί να βοηθήσουν στην αναγνώριση. Έτσι πολλά είδη βακτηριδίων μπορούν να διαχωριστούν με βάση την εμφάνιση της αποικίας.
3. Δεδομένου ότι η αποικία αντιπροσωπεύει ένα μόνο είδος, ένα δείγμα από μια καλά απομονωμένη αποικία μπορεί να μεταφερθεί σε αποστειρωμένο ζωμό ή άγαρ για το σχηματισμό μιας καθαρής καλλιέργειας. [13][15]

2.3.4 Ενδυνάμωση δειγμάτων

Στα δείγματα μας βρίσκονται μικροοργανισμοί όπου ο πληθυσμός τους όμως για διάφορους λόγους, ανάλογα με το περιβάλλον που βρίσκονται, είναι μικρός. Για να μπορέσει να εντοπιστεί και να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω επεξεργασία χρησιμοποιείτε η τεχνική της

ενδυνάμωσης του μικροβιακού πληθυσμού. Ανάλογα με το περιβάλλον και τις συνθήκες που βρίσκετε ο μικροβιακός πληθυσμός χρησιμοποιείτε και το κατάλληλο βιομέσο. Για κάθε περίπτωση είναι διαφορετικό. [5][6]

2.3.5 Απομόνωση μ/ο

Η απομόνωση μικροοργανισμών βασίζεται σε δύο βασικές αρχές:

1. Να πάρουμε όσο το δυνατόν καθαρότερο δείγμα από την πηγή.
2. Η λήψη καθαρής καλλιέργειας αφού παρά το γεγονός ότι προσπαθούμε αρχικά να λάβουμε «καθαρό» δείγμα αυτό δεν είναι πάντα εφικτό.

Αυτό επιτυγχάνετε όταν με την καλλιέργεια του δείγματος λάβουμε «μονόσπορες» καλλιέργειες. Ο όρος μονόσπορες υπονοεί το γεγονός ότι οι αποικίες που δημιουργούνται είναι από ένα μόνο κύτταρο βακτηρίου ή από ένα σπόριο ή από ένα κύτταρο μύκητα. Η καλλιέργεια από ένα μόνο μικροοργανισμό λέγεται καθαρή καλλιέργεια.

Για τις βακτηριακές καλλιέργειες ο καθαρισμός της καλλιέργειας επιτυγχάνεται με δύο τρόπους:

- α) Τη γραμμική διασπορά στο τρυβλίο σε στερεό υπόστρωμα και
- β) Τη διασπορά στο τρυβλίο είτε πάνω σε στερεό υπόστρωμα είτε σε ανάμιξη με υγροποιημένο υπόστρωμα και στη συνέχεια έκχυση και πήξη του μέσα σε τρυβλίο.

Για τους μύκητες η διασπορά γίνεται μόνο με τον δεύτερο τρόπο. [14][15]

2.3.6 Δημιουργία καθαρής υγρής καλλιέργειας

Για την καλύτερη και πιο εύκολη αποθήκευση των μικροοργανισμών γίνεται η δημιουργία καθαρής καλλιέργειας τους. Σε αυτή τη μέθοδο γίνεται η ανάπτυξη ενός μόνο μικροοργανισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα σύστασης ανάλογα με τις ανάγκες του μικροοργανισμού. Οι καθαρές υγρές καλλιέργειες μπορούν εύκολα να αποθηκευτούν για κάποιο χρονικό διάστημα σε χαμηλή θερμοκρασία για να χρησιμοποιηθούν όποτε χρειαστεί.

2.3.7 Φασματοφωτομετρία UV-Vis

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι χημικής ανάλυσης, χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την επίλυση διαφόρων χημικών προβλημάτων, που σχετίζονται με τη δομή, την κινητική, την ταυτοποίηση, την ποσοτική ανάλυση διαφόρων ενώσεων, κ.α.

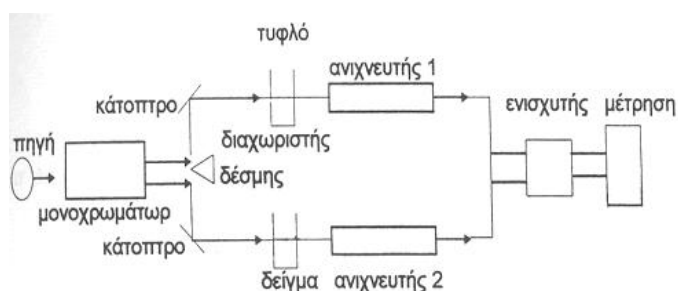
Τα πλεονεκτήματα αυτών των μεθόδων είναι:

1. Χρησιμοποιούμε μικρή ποσότητα δείγματος,

2. Δεν καταστρέφεται στο τέλος της ανάλυσης,
3. Έχουν μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία,
4. Χρειάζονται μικρό χρόνο μέτρησης.

Κάποια μόρια όταν ακτινοβοληθούν, απορροφούν μέρος της ακτινοβολίας και μάλιστα κάποια συγκεκριμένα μήκη κύματος. Όσο περισσότερα μόρια υπάρχουν στην δέσμη του φωτός, τόσο περισσότερο φως απορροφάται. Άρα μετρώντας την διαφορά της ποσότητας του φωτός, με και χωρίς τα προς μέτρηση μόρια μπορούμε να εκτιμήσουμε την ποσότητα τους. Η καταγραφή της έντασης της απορρόφησης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος, ή τη συχνότητα της ακτινοβολίας αποτελεί το φάσμα απορρόφησης, που είναι γραμμικό στα άτομα και ταινίες στα μόρια.[21]

Υπάρχουν δύο είδη φασματοφωτόμετρο. Το φασματοφωτόμετρο ορατής ακτινοβολίας και το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους



Σχήμα 2.3.1: Σχηματική παράσταση Φ.Φ UV-VIS [21]

Φασματοφωτόμετρο ορατού: Η πιο απλή μορφή φασματοφωτόμετρου είναι το φασματοφωτόμετρο ορατού φάσματος το οποίο μετρά σε μήκος κύματος από 400-800nm . Σε αυτό η πηγή είναι μια κοινή λάμπα πυράκτωσης. Το σύστημα διαχωρισμού είναι ένα κοινό πρίσμα το οποίο απομονώνει την επιθυμητή μονοχρωματική ακτινοβολία. Η ακτινοβολία αυτή περνάει μέσα από μια κυψελίδα, δηλ. διαφανές άχρωμο δοχείο που περιέχει το προς εξέταση δείγμα και όσο φως δεν απορροφά το διάλυμα μετρείται από ένα κοινό φωτόμετρο που βρίσκεται από την απέναντι πλευρά της κυψελίδας.

Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους (UV): 200-400nm. Η οργανολογία του είναι παρόμοια με αυτήν του ορατού. Οι διαφορές είναι δύο: Η πηγή είναι λυχνία Δευτερίου ή Ξένου, για να παράγει υπεριώδη ακτινοβολία και όλα τα εξαρτήματα δεν είναι από γυαλί αλλά από χαλαζία. [16][17][21][22]

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της απορρόφηση των δειγμάτων DNA φασματοφωτόμετρο UV-VIS το οποίο εμπεριέχει και λυχνία πυράκτωσης ώστε να μπορεί να γίνουν μετρήσεις και στο ορατό φάσμα.

2.3.8 Εξαγωγή DNA

Η μέθοδος εξαγωγής DNA είναι μια απλή, γρήγορη και εφαρμόσιμη μέθοδος εξαγωγής υψηλής ποιότητας DNA από διάφορους μικροοργανισμούς. Αποδείχθηκε εξαιρετικά χρήσιμη στην ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών και στην ανάλυση ταξινόμησης προκατυωτικών και ευκαριωτικών οργανισμών. Μπορεί να εφαρμοστεί και στην εξαγωγή συμπλόκων DNA από διάφορους ιστούς χωρίς οποιαδήποτε τροποποίηση. Δεν απαιτεί ακριβά και περιβαλλοντικά τοξικά υλικά και όργανα. Για την εξαγωγή DNA από περιβαλλοντικά δείγματα είναι απαραίτητος ο εμπλουτισμός και η απομόνωση αρκετής μικροβιακής καλλιιεργήσιμης βιομάζας γιατί η μέθοδος έχει το μειονέκτημα εξαγωγή μικρού ποσοστού DNA από μια μικροβιακή κοινότητα.

Η εξαγωγή του DNA από ένα κύτταρο πετυχαίνεται με συνδυασμό από χημικές, μηχανικές και θερμικές μεθόδους. Με τη χρήση διάφορων χημικών ουσιών, φίλτρων και φυγοκέντρησης πετυχαίνουμε τη λύση του κυττάρου και την απομάκρυνση όλων των συστατικών τους κρατώντας μόνο το DNA.[18][19][20]

2.3.9 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική ανάλυσης των νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών. Η ηλεκτροφόρηση του DNA μπορεί να γίνει σε αγαρόζη, πολυακρυλαμίδιο ή σύνθετο gel αγαρόζης- ακρυλαμίδης. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA και RNA μπορούν να διαχωριστούν σε ζελέ ηλεκτροφόρησης όταν βρίσκονται κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου. Για να αναλυθεί το DNA , υποχρεώνεται να περάσει διαμέσων των πόρων του ζελέ. Κάτω από ένα ηλεκτρικό πεδίο, το DNA μετακινείται προς το θετικό ηλεκτρόδιο ,απομακρύνοντας από το αρνητικό που αυτό οφείλεται στην ίδια αρνητική του φάση. Το ίδιο το DNA δεν είναι ορατό στο ζελέ αγαρόζης, γι' αυτό το λόγο, προστίθεται κατά την δημιουργία στο διάλυμα του ζελέ αγαρόζης χρωστική ουσία που συνδέεται στο DNA και είναι ορατή στο υπεριώδες φως. Το σύμπλεγμα που δημιουργείται μεταξύ της χρωστικής ουσίας και του DNA έχει ένα φάσμα φθορισμού με μέγιστο τα 312 nm. [17][18][19][20]

2.3.10 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια μέθοδος που αναπτύχθηκε το 1985 από τους Mullis και Silverstein και άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως το 1987 με την χρήση θερμοανθεντικών DNA πολυμερασών. Αποτελεί μια πρόσφατη επαναστατική ανακάλυψη της Μοριακής Βιολογίας η οποία σταδιακά αποκτά συνεχώς διευρυνόμενες κλινικές και διαγνωστικές εφαρμογές. Σήμερα θεωρείται μια από τις σημαντικότερες επιστημονικές ανακαλύψεις που έχει αλλάξει με επαναστατικό τρόπο την μελέτη του DNA.

Η τεχνική PCR θεωρείται εξαιρετικά ευαίσθητη δεδομένου ότι το τελικό προϊόν της μετά από 30-40 κύκλους ανέρχεται στο ένα δισεκατομμύριο αντίγραφα της αρχικής αλληλουχίας. Ο πολλαπλασιασμός αυτός είναι απαραίτητος διότι η περαιτέρω ανάλυση σε μοριακό επίπεδο χρειάζεται μεγάλο αριθμό αντιγράφων DNA.

Η τεχνική PCR βασίζεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών απλών διαδοχικών αντιδράσεων που επιτελούνται σε διαφορετική θερμοκρασία. Στο πρώτο βήμα του κύκλου γίνεται αποδιάταξη του DNA στόχου σε ψηλές θερμοκρασίες (94-95 βαθμούς κελσίου), στο δεύτερο βήμα του κύκλου η θερμοκρασία μειώνεται και πραγματοποιείται σύνδεση των εκκινητών στα άκρα του DNA στόχου και στο τρίτο και τελευταίο βήμα του κύκλου παρατηρείται ξανά αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C και πραγματοποιείται επέκταση των συμπληρωματικών αλυσίδων με τη βοήθεια του ενζύμου taq-πολυμεράσης.

Η επιτυχία της αντίδρασης πιστοποιείται μετά από ηλεκτροφόρηση ενός μικρού κλάσματος προϊόντος της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη συνέχεια τις περισσότερες φορές ακολουθεί είτε μεταφορά του DNA σε μεμβράνη και υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (ανιχνευτές) είτε ανάλυση της αλληλουχίας του προϊόντος PCR με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing) είτε ανίχνευση μεταλλαγμένων αλληλουχιών με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Οι παράμετροι που παίζουν ρόλο στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (PCR) είναι:

1. Η συγκέντρωση των εκκινητών πρέπει να είναι αρκετά υψηλή ώστε η σύνδεσή τους με την αντίστοιχη μονόκλωνη αλυσίδα να γίνεται γρήγορα και κατά την εξέλιξη της αντίδρασης η σύνδεση αυτή να είναι γρηγορότερη από την επανασύνδεση εκμαγείου-εκμαγείου.
2. Η εκλογή κατάλληλης θερμοκρασίας και χρόνου σε κάθε στάδιο της αντίδρασης βοηθά την ειδικότητα της αντίδρασης.
3. Η ειδικότητα και απόδοση της μεθόδου αυξάνεται με τη χρήση της Taq πολυμεράσης, αφού χρησιμοποιούνται υψηλότερες θερμοκρασίες στα στάδια σύνδεσης και επιμήκυνσης.

Η τεχνική PCR μπορεί να εφαρμοστεί σε δείγματα πολλών ειδών όπως αίμα, βιοψίες ιστών, σπέρμα, τρίχα, φρέσκους ιστούς καθώς και σε ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη και εμπεδωμένους σε παραφίνη. [17][18][19][20]

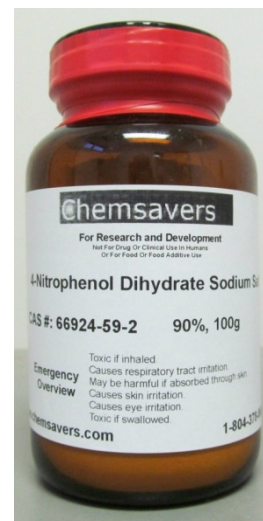


Φωτογραφία μηχανήματος PCR

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 4-Νιτροφαινόλη

Η 4-νιτροφαινόλη αποτελεί υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Το περιβάλλον αποτελεί φυσικό χώρο επιβίωσης των μικροοργανισμών. Απαντώνται τόσο στο έδαφος, όσο και στα νερά θαλασσών, λιμνών και ποταμών. Επίσης βρίσκονται στον αέρα υπό τη μορφή αιωρούμενων σωματιδίων, προσκολλημένα σε σκόνη ή προσροφημένα σε σταγονίδια νερού. Το είδος και η ποσότητα των μικροοργανισμών, συνιστούν τη μικροβιακή χλωρίδα του περιβάλλοντος, η οποία εξαρτάται από τις διάφορες συνθήκες.



Εικόνα 3.1: Νιτροφαινόλη στο μπουκάλι

3.1.1 Ενδυνάμωση δειγμάτων

Για την διαδικασία ενδυνάμωσης των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε ανάμιξη 100 ml βιομέσου με 2 κουταλάκια από το χώμα που συλλέχθηκε από το ρυπασμένο περιβάλλον. Η ενδυνάμωση έγινε με βιομέσο σύστασης όπως φαίνεται στο πίνακα 3.1. Με αυτή την μέθοδο επιτυγχάνουμε την προσθήκη



Φωτογραφία Βιομέσου για

ανόργανων αλάτων για τον καλύτερο μεταβολισμό των μικροοργανισμών και την προσθήκη εύκολα διασπάσιμων οργανικών, που βοηθούν στην αργή διάσπαση της νιτροφαινόλης και αύξηση της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών που την καταναλώνουν. Για την παρασκευή του βιομέσου διαλύθηκαν σε ένα λίτρο απιονισμένο νερό τις συγκεντρώσεις χημικών ουσιών που φαίνονται στον πίνακα 3.1 και στη συνέχεια έγινε αποστείρωση στον κλίβανο. Στην συνέχεια αφού έγινε προσαρμογή του pH, χρησιμοποιώντας αραιό οξύ και βάση, κοντά σε pH 7, αφέθηκε να κρυώσει και εμβολιάστηκαν περίπου 5ml από τα δείγματα σε 60ml βιομέσου.

Πίνακας 3.1: Σύσταση βιομέσου για ενδυνάμωση των δειγμάτων

Χημική ουσία	Συγκέντρωση (g/L)
CaCl ₂	0.02
KH ₂ PO ₄	1
NH ₄ Cl	0.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
NaCl	0.2
MgCl ₂	0.2
4-nitrophenol	0.05

Οι καλλιέργειες που δημιουργήθηκαν, αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασίες 33 ° C με ανάδευση (105rpm) για μια εβδομάδα. και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ελάχιστο μέσο αλάτι και συμπληρώθηκαν με 5mg/L νιτροφαινόλης ως η μόνη πηγή άνθρακα. Στη συνέχεια η ενδυνάμωση επαναλήφθηκε για αρκετές φορές προσθέτοντας στην αρχική σύσταση του βιομέσου (πίνακας 3.1) 1g ζύμης (Yeast) και 1 g πεπτόνη.

Τα στελέχη που αυξήθηκαν ταχύτερα και γρήγορα μετά από έξι διαδοχικές αραιώσεις, γύρισαν από το κίτρινο στο άχρωμο και επιλέχθηκαν για περαιτέρω έρευνα.

3.1.2 Εμβολιασμός σε τρυβλία

Πριν την προετοιμασία των θρεπτικών υποστρωμάτων, πήραμε ποσότητα από δείγματα χόματος του εμπλουτισμού, τα οποία τοποθετούνται σε φυγόκεντρο για ένα λεπτό ώστε τα ιζήματα να καθιζάνουν. Αυτά τα δείγματα επιλέχθηκαν με βάση τον αποχρωματισμό τους τα οποία έχουν περάσει την φάση επώασης και έφτασαν στην εκθετική φάση και αποχρωματίστηκαν.



Φωτογραφία εμβολιασμένων Τρυβλίων

Για την παρασκευή των τρυβλίων φτιάχτηκε βιομέσο με τη σύσταση που φαίνεται στο πιο κάτω πίνακα 3.2 και αποστειρώθηκε όπως και όλα τα βιομέσα που χρησιμοποιήθηκαν κατά αυτή την εργαστηριακή έρευνα.

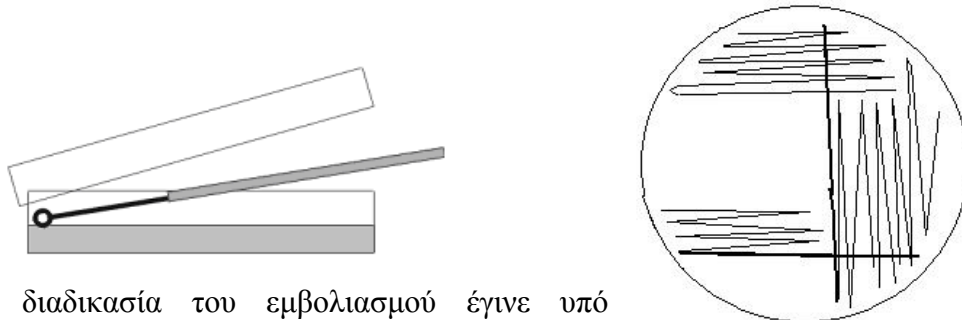
Πίνακα 3.2: Σύσταση στερεού βιομέσου για εμβολιασμό σε τρυβλία

Χημική ουσία	Συγκέντρωση (g/L)
CaCl ₂	0.01
KH ₂ PO ₄	1.5
NH ₄ Cl	0.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
NaCl	1
Mg SO ₄ ·7H ₂ O	0.120
Fe ₂ SO ₄ ·H ₂ O	0.001
Agar	15
4-nitrophenol	0,15

Μετά αφού προσαρμόστηκε το pH σε pH 7 αφέθηκε να κρυώσει λίγο. Στην συνέχεια προστέθηκαν περίπου 10-20 ml από το βιομέσο σε τρυβλία Petri, ανακινήθηκαν ελαφρά για να απλώσει το βιομέσο και αφέθηκε το περιεχόμενο να πήξει με κλειστό το καπάκι του τρυβλίου για να μην υπάρχει πιθανότητα μόλυνσης. Το άγαρ σε ψηλές θερμοκρασίες είναι σε υγρή μορφή ενώ όταν κρυώσει στερεοποιείται. Αφού τοποθετήθηκε το βιομέσο στα τρυβλία και αφέθηκε να κρυώσει, χρησιμοποιώντας πλαστικούς κρίκους εμβολιασμού μιας χρήσης εμβολιάστηκαν από τα δείγματα και απλώθηκαν σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, απλώνετε στο τρυβλίο με τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1.

Στο τέλος κλείνονται τα τρυβλία, τοποθετούνται ανάποδα για να μειωθεί η πιθανότητα μόλυνσης καθώς και η ανάπτυξη υδρατμών και αφήνονται σε θερμοκρασία 30°C για την επώαση των μικροοργανισμών.

Εικόνα 3.1: Κρίκος εμβολιασμού αριστερά και Μέθοδος παράλληλων γραμμών κατά τον εμβολιασμό δεξιά.



Όλη η διαδικασία του εμβολιασμού έγινε υπό ελεγχόμενες συνθήκες από φλόγα και αφού καθαρίσαμε τόσο τη γύρω περιοχή όσο και τα χέρια μας με αιθανόλη 70%, έτσι ώστε να επικρατούν ασηπτικές συνθήκες.

Μετά από δέκα μέρες αφού κάναμε τις απαραίτητες παρατηρήσεις για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών συνεχίσαμε με περαιτέρω επεξεργασία των δειγμάτων μας. Οι αποικίες που αναπτύσσονται στην επιφάνεια των τρυβλίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλια σε νέα θρεπτικά υποστρώματα για προετοιμασία νέων καθαρών μικροβιακών καλλιέργειών.

3.1.3 Δημιουργία Καθαρής καλλιέργειας αποικίας σε τρυβλία

Για την καθαρή απομόνωση αποικίας σε τρυβλίο αρχικά πρέπει να παρασκευαστεί το κατάλληλο βιομέσο. Σ' αυτή τη περίπτωση για να δούμε αν μπορούν οι



Φωτογραφία καθαρής αποικίας σε τρυβλίο

μικροοργανισμοί που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία χωρίς την ύπαρξη άλλης πηγής άνθρακα παραμόνο του βιομηχανικού χόματος παρασκευάστηκε βιομέσο, το οποίο είχε την ίδια σύσταση με το βιομέσο που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των εμπλουτισμένων δειγμάτων σε τρυβλία. Στην συνέχεια αφού εμβολιάστηκαν τα τρυβλία με την ίδια μέθοδο όπως και στον εμβολιασμό των τρυβλίων.

Στο τέλος κλείνονται τα τρυβλία, τοποθετούνται ανάποδα για να μειωθεί η πιθανότητα μόλυνσης καθώς και η ανάπτυξη υδρατμών και τα αφήσαμε σε θερμοκρασία 30°C έτσι ώστε να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί.

Ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε αερόβιες συνθήκες. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατός ο διαχωρισμός και η απομάκρυνση των κυττάρων μεταξύ τους ώστε να αναπτυχθούν μεμονωμένες αποικίες. Κάθε αποικία αντιπροσωπεύει μια καθαρή καλλιέργεια. Στην συνέχεια παρασκευάστηκαν υγρές καθαρές καλλιέργειες.

3.1.4 Δημιουργία υγρής καθαρής καλλιέργειας

Για να δημιουργήσουμε υγρές καθαρές καλλιέργειες κατασκευάστηκε βιομέσο με σύσταση όπως φαίνεται πιο κάτω στον πίνακα 3.3 και στη συνέχεια έγινε αποστείρωση στον κλίβανο.

Πίνακας 3.3: Σύσταση βιομέσου για δημιουργία υγρής καθαρής καλλιέργειας.

Χημική ουσία	Συγκέντρωση (g/L)
CaCl ₂	0.02
KH ₂ PO ₄	1
Fe ₂ SO ₄ H ₂ O	0.001
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
NaCl	0.2

MgCl ₂	0.2
4-nitrophenol	0.05

Στην συνέχεια αφού έγινε προσαρμογή του pH σε pH 7, χρησιμοποιώντας αραιό οξύ και βάση, αφέθηκε να κρυώσει.

Αφού το βιομέσο κρύωσε τοποθετήθηκαν περίπου 50-60 ml του βιομέσου σε αποστειρωμένα γυάλινα δοχεία αφού πρώτα περάστηκαν πάνω από φλόγα για τη θανάτωση τυχόν άλλων μικροοργανισμών που υπήρχαν. Έπειτα με τη χρήση κρίκων εμβολιασμού, εμβολιάστηκαν τα δοχεία με το βιομέσο, από τις αποικίες που επιλέχθηκαν. Σε κάθε γυάλινο δοχείο εμβολιάστηκε μόνο μία αποικία από τα τρυβλία με τις καθαρές καλλιέργειες των μικροοργανισμών.



Φωτογραφία καθαρής υγρής καλλιέργειας του μικροοργανισμού BH2

Τέλος τα γυάλινα δοχεία κλείστηκαν και τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία 35 °C με αναοευση για ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Όταν τα εμβολιασμένα δοχεία αρχίσουν να αλλάζουν χρώμα και από κίτρινο που είναι το χρώμα της νιτροφαινόλης έγιναν καφέ-κίτρινα, ως ένδειξη ανάπτυξης των μικροοργανισμών, τότε παρατηρείται αποικοδόμηση της νιτροφαινόλης.

3.1.5 Αποθήκευση μικροοργανισμών

Αφού οι υγρές καθαρές καλλιέργειες άλλαξαν χρώμα, μέρος τους αποθηκεύτηκε με δύο τρόπους για την μετέπειτα επεξεργασία τους.

Η πρώτη έγινε για την περαιτέρω χρήση τους για εξαγωγή του DNA. Με τη χρήση πιπέττας προστέθηκαν σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες χωρητικότητας 2ml, 1.5ml από τις καθαρές υγρές καλλιέργειες. Έπειτα φυγοκεντρήθηκε στις 13000 στροφές για δύο λεπτά, για να κατακαθίσει η στερεή βιομάζα και ακολούθως αφαιρέθηκε το υγρό. Στη συνέχεια προστέθηκε άλλο υγρό δείγμα από τις καθαρές καλλιέργειες και επαναλάβαμε τη διαδικασία μέχρι να υπάρχει αρκετό στερεό υπόλειμμα βιομάζας στους σωλήνες. Τέλος τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν, φυλάχτηκαν στην κατάψυξη, σε θερμοκρασία -18°C.

Η δεύτερη αποθήκευση έγινε σε γλυκερόλη. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 15 ml προστέθηκαν 7ml γλυκερόλης και 7ml από τις υγρές καθαρές καλλιέργειες. Σκοπός αυτής της αποθήκευσης είναι η μελλοντική παρασκευή της καλλιέργειας. Όπως και στην πρώτη αποθήκευση έτσι και στην δεύτερη, τα δείγματα φυλάχθηκαν στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -18°C . Όπως και οι άλλες διαδικασίες έτσι και αυτή έγινε σε ασηπτικές συνθήκες.

3.1.6 Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας

Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων για την μέτρηση της απορρόφησης της Νιτροφαινόλης έγινε στα 400nm. Σε γυάλινη κυψελίδα τοποθετήσαμε 1ml από τα δείγματα και μετρήσαμε την οπτική τους απορρόφηση. Η μέτρηση έγινε τρεις φορές για το κάθε δείγμα και στην συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων. Από τις μετρήσεις των διαλυμάτων γλυκόζης κατασκευάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης, για την μέτρηση της απορρόφησης της Νιτροφαινόλης, η οποία παρουσιάζεται στα αποτελέσματα.

Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας πραγματοποιήθηκε σε κάποια από τα δείγματα και σε όλο το φάσμα ακτινοβολίας στο οποίο μπορεί να μετρήσει το φασματοφωτόμετρο. Η μέτρηση έγινε σε γυάλινη κυψελίδα έτσι ώστε η μέτρηση να έχει μεγαλύτερο φάσμα. Οι μετρήσεις από το φασματοφωτόμετρο παρουσιάζονται σε πίνακες στα Παραρτήματα και σε γραφικές στα αποτελέσματα.

3.1.7 Εξαγωγή DNA

Η επιλογή δειγμάτων που περιείχαν καλλιέργειες μικροοργανισμών έγινε με βάση τον βαθμό αποδόμησης της νιτροφαινόλης και τον βαθμό αποχρωματισμού.

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από υγρή καλλιέργεια, επιλέξαμε για αρχή τα δείγματα μας με το μεγαλύτερο αποχρωματισμό. Το δείγμα που επιλέχθηκε ήταν αυτό από την Βιομηχανία (H2) το οποίο φάνηκε να έχει μεγάλη αποικοδόμηση σε σύγκριση πάντα με το χρώμα του control. Το χρώμα του είναι καφέ και αυτό γιατί κατά την διάσπαση της νιτροφαινόλης παραγόταν επίσης και μια δευτερεύων ουσία με αυτό το χρώμα. Για να φανεί αν η καλλιέργεια των μικροοργανισμών είναι καθαρή πρέπει να εξάγουμε το DNA. Στόχος είναι να απομονώσουμε το DNA από τη βιομάζα και ακολούθως να σπάσουμε τη βιομάζα.

- Από την καλλιέργεια του δείγματος από την Βιομηχανία (H2) μεταφέρονται 2 ml με τη βοήθεια της πιπέτας σε σωληνάριο για την πραγματοποίηση της φυγοκέντρησης. Μετά από φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα και με ταχύτητα 11000 στροφές απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό και κρατείται η στερεή ποσότητα, η βιομάζα. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται όσο το δυνατόν περισσότερες φορές έτσι ώστε να συλλεχθεί η μέγιστη ποσότητα στερεής βιομάζας.
- Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε τοποθέτηση κεραμικών σφαιριδίων σε σωληνάκια ώστε να επιτευχθεί η διάσπαση βιομάζας και έγινε προσθήκη 700 μL από ουσία SL1 σε ένα σωληνάριο και σε ένα δεύτερο προσθήκη 150 μL από ουσία SX και ανακινούμε τα σωληνάκια με τη χρήση του vortex για 5 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στις 11000 στροφές. Αυτός είναι ένας μηχανικός τρόπος για να απελευθερωθεί το DNA από το κύτταρο.
- Ακολούθως μεταφέρουμε το υγρό σε καινούργια σωληνάκια και προσθέτουμε 150 μL από το αντιδραστήριο SL3 το οποίο απομακρύνει τα χημικά από τα δείγματα μας. Ανακινούμε στο vortex για 5 δευτερόλεπτά και στη συνέχεια τα τοποθετούμε για στην κατάψυξη σε θερμοκρασία 4°C για 5 λεπτά. Το 3^ο στάδιο ολοκληρώνεται με φυγοκέντρηση για 1 λεπτό με ταχύτητα 11,000 στροφών. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η καθίζηση των συστατικών του κυττάρου. Μετά τη φυγοκέντρηση παρατηρήθηκε αφρισμός και για την διάλυσή του επαναλάβαμε την φυγοκέντρηση.
- Στην συνέχεια προσθέσαμε 250 μL SB και ακολούθως ανακινήσαμε στο vortex για 5 δευτερόλεπτα. Μετακινήσαμε τα δείγματα σε καινούργια σωληνάκια στα οποία τοποθετούμε μια κόκκινη μεμβράνη που συγκρατούσε τις ουσίες με ίδιο μοριακό βάρος με το DNA εκτός του DNA. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό με ταχύτητα 11000 στροφών. Τέλος πετάμε τα κόκκινα φίλτρα και κρατάμε το υγρό δείγμα που μένει στα σωληνάκια μετά την φυγοκέντρηση.
- Ακολούθως για την δέσμευση του DNA, τοποθετήθηκε σε καινούργια σωληνάκια το πράσινο φίλτρο, μέσα από το οποίο προστίθεται 500 μL δείγματος. Στην συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση με ταχύτητα 11,000 στροφών για 1 λεπτό. Αδειάζουμε το διήθημα που μένει στα σωληνάκια και κρατάμε το φίλτρο.
- Για την απομάκρυνση των ακαθαρσιών προσθέσαμε 500 μL SB στο φίλτρο και φυγοκεντρήσαμε για 30 δευτερόλεπτα με ταχύτητα 11000 στροφών. Στην συνέχεια πετάμε το διήθημα και κρατάμε το φίλτρο.

- Για την απομάκρυνση των ενζύμων, των πρωτεϊνών και της περικυτταρικής μεμβράνης, προστίθενται στο φίλτρο 500μL SW1. Μετά την προσθήκη ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα με ταχύτητα 11,000 στροφών. Τέλος πετάμε το διήθημα και κρατάμε το φίλτρο.
- Στην συνέχεια προσθέτουμε 700 μL SW2 και πραγματοποιείται ανακίνηση με τη χρήση vortex για 2 δευτερόλεπτα. Ακολούθως τοποθετείται στη φυγόκεντρο για 30 δευτερόλεπτα με ταχύτητα 11000 στροφές. Αφαιρείται το υγρού από το σωλήνα και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση για 2 λεπτά έτσι ώστε να στεγνώσει το φίλτρο.
- Σε καινούργια σωληνάκια τοποθετείται μόνο το πράσινο φίλτρο πάνω στο οποίο υπάρχει το DNA, προστίθεται 100μL της ουσίας SE η οποία απομακρύνει το DNA από το φίλτρο. Στο τέλος αφήνουμε με το καπάκι ανοιχτό σε θερμοκρασία δωματίου για ένα λεπτό και αφού κλείσουμε το καπάκι ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.

Χρησιμοποιούμε καινούργια σωληνάκια για τη φύλαξη των δειγμάτων.

Το DNA που έχει εξαχθεί διατηρείτε στην κατάψυξη στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση PCR για τον πολλαπλασιασμό του.

3.1.8 Ηλεκτροφόρηση

Η μέθοδος ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται ιδιαίτερος στο διαχωρισμό τμημάτων DNA που έχουν προκύψει μετά από επεξεργασία.

Το ζελέ αγαρόζης δημιουργείται με την προσθήκη 6γρ. σκόνης αγαρόζης σε 400ml ρυθμιστικό διάλυμα TAE συγκέντρωσης 1M μαζί με 20μl κόκκινης χρωστικής ουσίας. Στην συνέχεια θερμαίνουμε το μίγμα σε φούρνο μικροκυμάτων, 4 λεπτά περίπου, μέχρι να γίνει διανυγές και στη συνέχεια χύνεται σε δίσκο χύτευσης, ο οποίος είναι φτιαγμένος από καθαρή κολλητική ταινία γύρω από το ακρυλικό διαφανή δίσκο και αφήνεται να στερεοποιηθεί. Το αποτέλεσμα είναι ένα ευλύγιστο ζελέ.

Κατά την διάρκεια ηλεκτροφόρησης, το ζελέ βρίσκεται βυθισμένο σε ειδικό θάλαμο που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TAE συγκέντρωσης 1M και επιπλέον, θετικό και αρνητικό ηλεκτρόδιο. Τα δείγματα του DNA αναμιγνύονται με ρυθμιστική χρωστική ουσία, την λεγόμενη buffer loading, χρώματος μπλε και τοποθετούνται με προσοχή στα αντίστοιχα διάκενα του ζελέ που δημιουργήθηκαν από το tray. Με την τοποθέτηση ηλεκτροδίων στα άκρα της πλάκας εξασφαλίζεται η εφαρμογή τάσης μεταξύ τους. Η τάση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση των διαφόρων θραυσμάτων DNA προς το θετικό πόλο, καθώς

αποτελούνται από νουκλεοτίδια που είναι αρνητικά φορτισμένα (η φωσφορική ομάδα λόγω απόδοσης πρωτονίων φέρει αρνητικό φορτίο).

Επειδή όμως η ταχύτητα μετακίνησης ενός θραύσματος εξαρτάται από το μέγεθος του (τα μεγάλα θραύσματα κινούνται πιο αργά από τα μικρά) σε μια δεδομένη χρονική στιγμή τα μικρότερα θραύσματα προπορεύονται έναντι των μεγαλύτερων κατά την κίνησή τους προς το θετικό πόλο, με αποτέλεσμα να μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους. Με τη μέθοδο αυτή τα θραύσματα που έχουν προκύψει από την επεξεργασία ενός μορίου DNA διαχωρίζονται με βάση την απόσταση που έχουν διανύσει από την άνοδο.

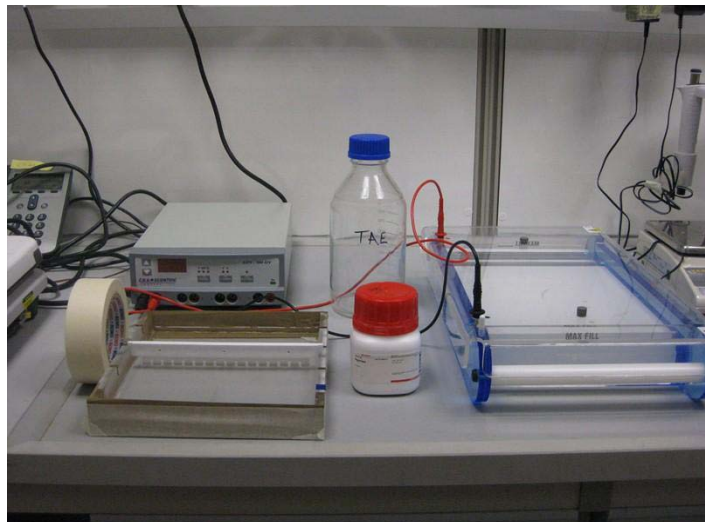
Στο πρώτο και το τελευταίο διάκενο τοποθετήθηκαν 10 μl ουσίας lader η οποία δείχνει σε ποιο σημείο θα πρέπει να φαίνονται τα κομμάτια του DNA. Η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει μέρος σε ένταση 100mA για μιάμιση ώρα σε θερμοκρασίες δωματίου. Μετά την ηλεκτροφόρηση το ζελέ τοποθετείται σε κάμερα όπου και διοχετεύεται στο ζελέ υπεριώδης ακτινοβολία και λαμβάνεται εικόνα φθορισμού από την χρωμάτωση με την κόκκινη χρωστική ουσία των διαχωρισμένων μορίων του DNA.

Φωτογραφία της συσκευής ηλεκτροφόρησης

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1 4-νιτροφαινόλη

Κατά την διαδικασία ανάπτυξης του μικροβιακού πληθυσμού των δειγμάτων σε τρυβλία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από φυτόχομα, από χωράφι με λύματα, χωράφι από παράκτια αλυκής, δείγμα από το Βάλτο Καμάρων, από την δεξαμενή αερισμού του Σάλα και από Βιομηχανία. Όλα τα παραπάνω δείγματα εμβολιάστηκαν σε τρυβλία με συγκέντρωση π-νιτροφαινόλης στο στερεό βιομέσο ίση 100 mg/L και παρατηρήθηκε μεγάλη



ανάπτυξη μικροοργανισμών σε αρκετά από τα τρυβλία. Στην διαδικασία απομόνωσης καθαρών αποικιών σε τρυβλία με συγκέντρωση π-νιτροφαινόλης, 100 mg/L και σε υγρή καθαρή καλλιέργεια με διάφορες συγκεντρώσεις δοκιμάστηκαν όλα τα δείγματα.

Κατά την πραγματοποίηση των καθαρών καλλιεργειών στα τρυβλία, παρουσιάστηκε αυξημένη ανάπτυξη αποικιών του δείγματος που πάρθηκε από τη Βιομηχανία. Τότε δυο ξεχωριστές αποικίες, (BH1 και BH2), έγιναν αντιληπτές ενώ στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη καθαρής υγρής καλλιέργειας.

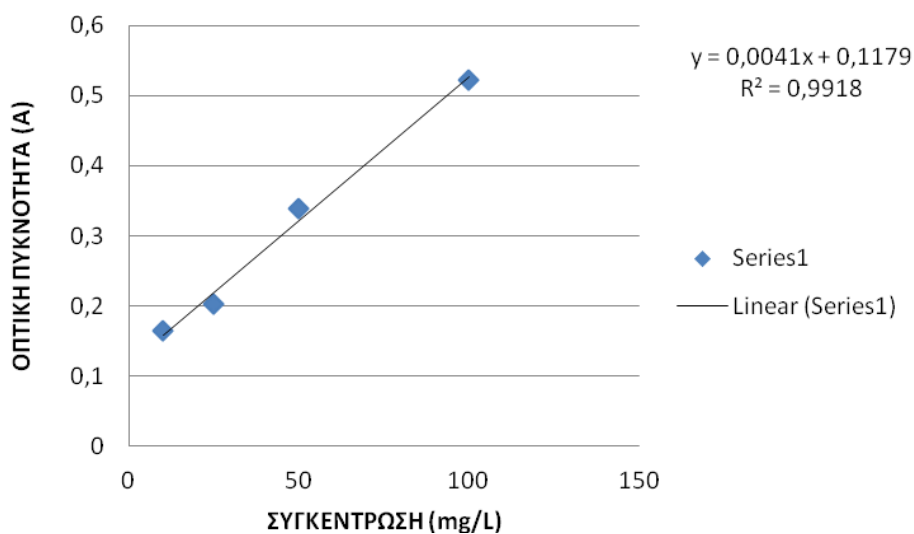
Από την δημιουργία των δύο διαφορετικών υγρών καλλιεργειών παρατηρήθηκε από της πρώτες μέρες αλλαγή στο δείγμα με την ονομασία BH2, παρατηρήθηκε αλλαγή στο χρώμα, (από κίτρινο που είναι το χρώμα της νιτροφαινόλης έγινε άχρωμο) και έτσι για περαιτέρω επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε μόνο ο μικροοργανισμός από το δείγμα BH2.

Έπειτα ακολούθησε η χρήση του μικροοργανισμού BH2, ο οποίος επεξεργάστηκε με περισσότερη λεπτομέρεια σε διαφορετικές συγκεντρώσεις νιτροφαινόλης. Πριν από κάθε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας, γινόταν δέκα φορές αραίωση διαλυμάτων.

Από την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των διαλυμάτων πήραμε τα αποτελέσματα που φαίνονται στο Πίνακα 4.1, από τα οποία κατασκευάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης έτσι όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 4.1.

Διάλυμα (mg/L)	ΟΠΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ (A)
100	5,226
50	3,396
25	2,026
10	1,64

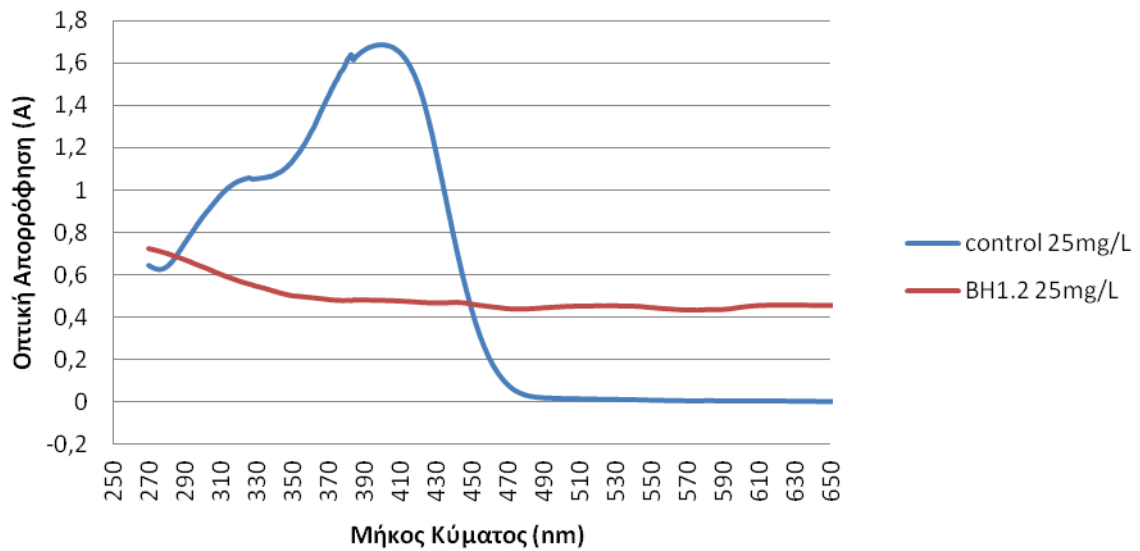
Πίνακας 4.1: Αποτελέσματα από μετρήσεις οπτικής πυκνότητας των διαλυμάτων σε A



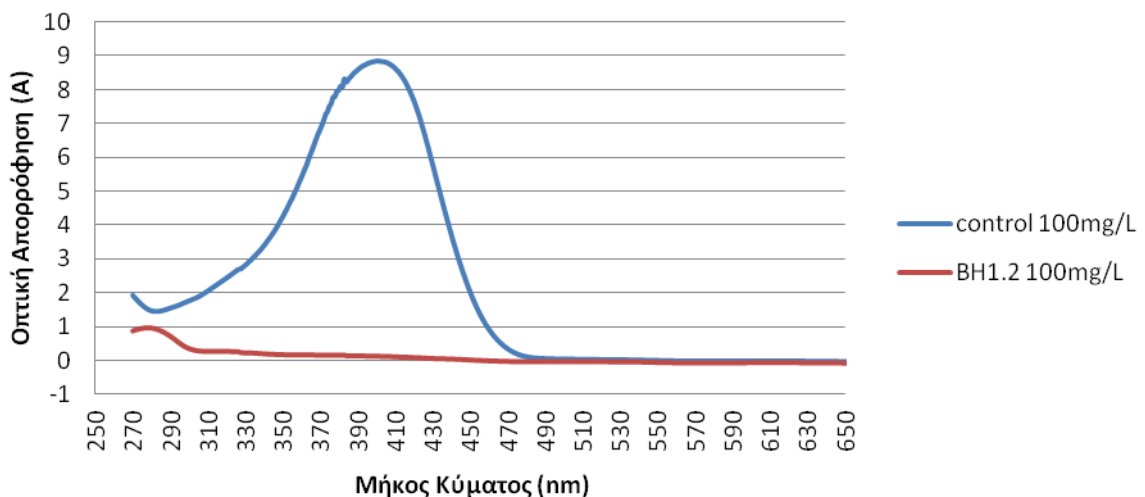
Διάγραμμα 4.1: Καμπύλη βαθμονόμησης οπτικής πυκνότητας(A) ως προς την συγκέντρωση (mg/L)

Από την καμπύλη βαθμονόμησης φαίνεται ότι το $R^2=0,9918$, αυτό δείχνει ότι η καμπύλη είναι γραμμική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου στα δείγματα.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν υγρές καθαρές καλλιέργειες σε συγκεντρώσεις νιτροφαινόλης 25 mg/L, και 100 mg/L, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν μετά από 168h. Η αλλαγή χρώματος που παρατηρήθηκε στα διαλύματα, μετρήθηκε σε όλο το φάσμα που καλύπτει το φασματοφωτόμετρο. Όλες οι μετρήσεις που λήφθηκαν, παρουσιάζονται στο διάγραμμα 4.2 και 4.3 αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4.2: Φάσμα απορρόφησης του διαλύματος σε συγκέντρωση 25 mg/L



Διάγραμμα 4.3: Φάσμα απορρόφησης του διαλύματος σε συγκέντρωση 100 mg/L

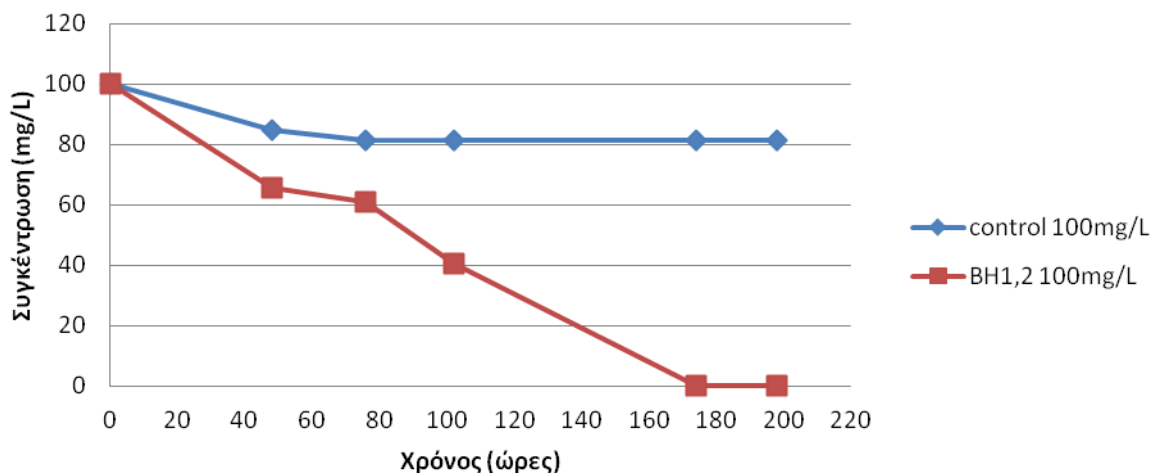
Για την πραγματοποίηση του διαγράμματος 4.3 για το φάσμα απορρόφησης του διαλύματος σε συγκέντρωση 100 mg/L πραγματοποιήθηκε αρραίωση 4 φορές.

Στο διάλυμα της νιτροφαινόλης με συγκέντρωση 25 mg/L, όπως και στο διάλυμα με συγκέντρωση 100 mg/L, παρατηρήθηκε αύξηση της απορρόφησης σε ακτινοβολίες με μήκος κύματος 400 nm, ενώ στο υπόλοιπο φάσμα η οπτική απορρόφηση ήταν πάρα πολύ μικρή. Η νιτροφαινόλη σύμφωνα με την βιβλιογραφία απορροφά ακτινοβολία μήκους κύματος περίπου στα 400 nm αυτό φαίνεται και από το διάγραμμα 4.2 και 4.3 που πάρθηκαν από τις μετρήσεις τις οπτικής πυκνότητας σε όλο το φάσμα απορρόφησης (250 nm-700 nm), από τα δύο παραπάνω διαλύματα.. Με κόκκινη ευθεία στα διαγράμματα παρουσιάζεται η οπτική απορρόφηση του control σε κάθε περίπτωση.

Στο διάλυμα με συγκέντρωση νιτροφαινόλης 25 mg/L παρουσιάστηκε αύξηση στην απορρόφηση και τοπικά μέγιστα σε μήκη κύματος εκτός από τα 400 nm και στα 322 nm. Αυτό υποδεικνύει την παρουσία στο διάλυμα άλλων ουσιών που δημιουργήθηκαν από τον μικροοργανισμό. Λογικά ο μικροοργανισμός για την ανάπτυξη του χρησιμοποίησε την νιτροφαινόλη εφόσον ήταν η μόνη πηγή άνθρακα στο θρεπτικό υπόστρωμα, έτσι το τοπικό μέγιστο που παρουσιάστηκε στα 322 nm ίσως να οφείλεται σε ουσίες που μπορεί να είναι προϊόντα της βιοαποικοδόμησης της νιτροφαινόλης και για αυτό το λόγο η συγκέντρωσή της να έχει μειωθεί. Ίσως από την άλλη περίπτωση πάλι, αυτές οι ουσίες να είναι κάποιου είδους εξωένζυμα τα οποία εκκρίνουν οι μικροοργανισμοί. Έτσι είναι αναγκαίο να γίνει ανάλυση και μέτρηση της ακριβούς συγκέντρωσης της νιτροφαινόλης.

Για αυτό τον λόγο πραγματοποιήθηκε περαιτέρω επεξεργασία του μικροοργανισμού BH2 σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις νιτροφαινόλης.

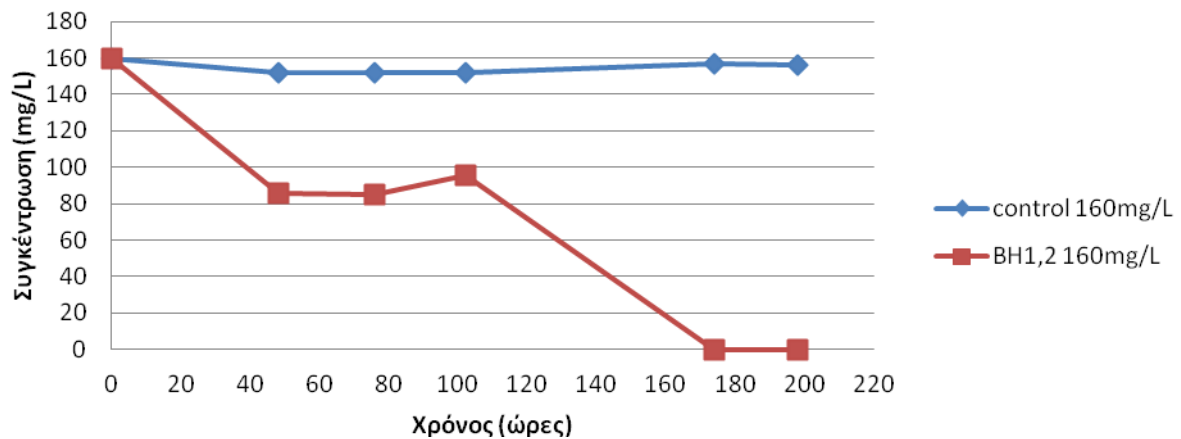
Στο διάγραμμα 4.4 παρουσιάζεται η καμπύλη συγκέντρωσης της νιτροφαινόλης σε συγκέντρωση 100 mg/L σε σχέση με τον χρόνο, όπως επίσης και το control σε συγκέντρωση 100 mg/L. Τα πιο πάνω διαλύματα, πραγματοποιήθηκαν σε pH 7 κάτω από ασηπτικές συνθήκες όπως και σε όλα τα διαλύματα αυτής της εργασίας.



Διάγραμμα 4.4: Καμπύλη συγκέντρωσης νιτροφαινόλης στα 100mg/L σε σχέση με τον χρόνο.

Από το διάγραμμα 4.4 παρατηρείται αρχικά μείωση της συγκέντρωσης της νιτροφαινόλης στο control μετά από 48 περίπου ώρες, η οποία φτάνει μέχρι τα 82 mg/L περίπου και στην συνέχεια σταθεροποιείται. Στο διάλυμα το οποίο έχει εμβολιαστεί με τον μικροοργανισμό BH2 παρατηρείται σταδιακή μείωση στην συγκέντρωση της νιτροφαινόλης μέχρι τις 174 ώρες που φτάνει σε συγκέντρωση νιτροφαινόλης στο διάλυμα στα 0 mg/L.

Στο διάγραμμα 4.5 παρουσιάζεται η καμπύλη συγκέντρωσης της νιτροφαινόλης σε συγκέντρωση 160 mg/L σε σχέση με τον χρόνο, όπως επίσης και το control σε συγκέντρωση 160 mg/L. Το διάλυμα της συγκέντρωσης της νιτροφαινόλης στα 160 mg/L, όπως και το control στα 160 mg/L, πραγματοποιήθηκαν σε pH 7.



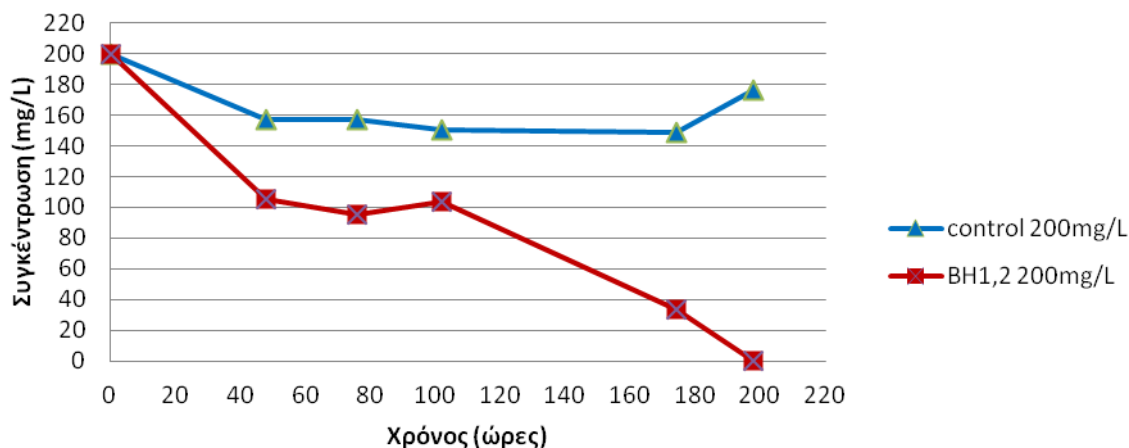
Διάγραμμα 4.5: Καμπύλη συγκέντρωσης νιτροφαινόλης στα 160 mg/L σε σχέση με τον χρόνο.

Από το διάγραμμα 4.5 παρατηρείται να αρχίζει η μείωση της συγκέντρωσης της νιτροφαινόλης μετά από 48 περίπου ώρες. Το control αρχικά μειώνεται πολύ λίγο μέχρι τα 150 mg/L περίπου ενώ στην συνέχεια σταθεροποιείται.

Στο διάλυμα με την συγκέντρωση 160 mg/L, το οποίο έχει εμβολιαστεί με τον μικροοργανισμό BH2 παρατηρείται αρχικά, μια μείωση στην συγκέντρωση της νιτροφαινόλης μέχρι τις 76 ώρες όπου η συγκέντρωση της νιτροφαινόλης στο διάλυμα αυξάνεται ελάχιστα σύμφωνα με την μέτρηση μας. Αυτό δεν είναι σωστό αφού δεν επηρεάστηκε από κανένα εξωτερικό παράγοντα και επικρατούσαν συνεχώς οι ίδιες συνθήκες. Μπορεί η μέτρηση αυτή να βγήκε λάθος από σφάλματα κατά την πραγματοποίηση των αραιώσεων, ή τον μη καλό καθαρισμό της γυάλινης κυψελίδας που χρησιμοποιήθηκε από την προηγούμενη μέτρηση.

Παρατηρείται ότι από τις 174 ώρες και μετά η συγκέντρωση της νιτροφαινόλης στο διάλυμα είναι ίση με 0 mg/L και για αυτό το λόγο δεν παίρνονται άλλα δείγματα για μέτρηση από το συγκεκριμένο διάλυμα.

Στο διάγραμμα 4.6 παρουσιάζεται η καμπύλη συγκέντρωσης της νιτροφαινόλης σε συγκέντρωση 200 mg/L σε σχέση με τον χρόνο, όπως επίσης και το control σε συγκέντρωση 200 mg/L. Το διάλυμα της συγκέντρωσης της νιτροφαινόλης στα 200 mg/L, όπως και το control στα 200 mg/L, πραγματοποιήθηκαν σε pH 7.

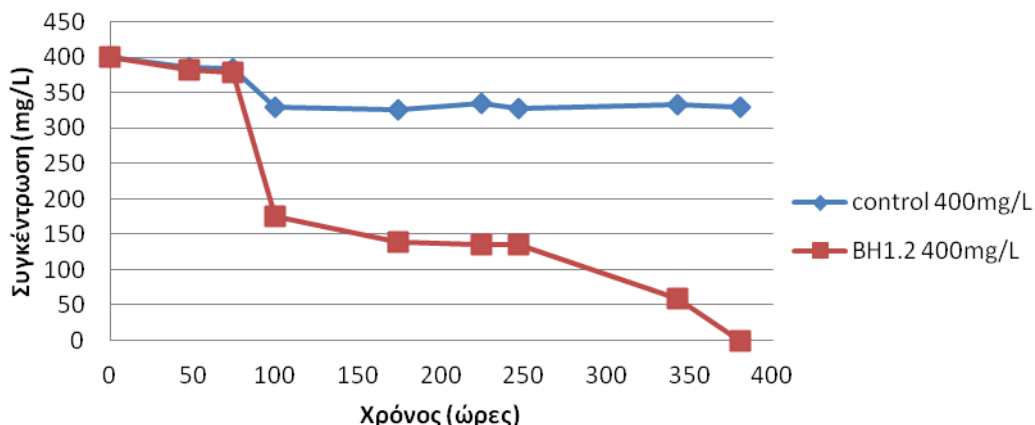


Διάγραμμα 4.6: Καμπύλη συγκέντρωσης νιτροφαινόλης στα 200 mg/L σε σχέση με τον χρόνο.

Από το διάγραμμα 4.6 παρατηρείται να αρχίζει η μείωση της συγκέντρωσης της νιτροφαινόλης μετά από 48 περίπου ώρες. Το control αρχικά μειώνεται μέχρι τα 160 mg/L περίπου ενώ στην συνέχεια σταθεροποιείται, μέχρι τις 175 ώρες περίπου όπου αρχίζει να παρατηρείτε αύξηση στο control. Η αύξηση αυτή μπορεί να οφείλεται σε τυχόν μόλυνση του control για αυτό τον λόγο δεν πάρθηκαν άλλες μετρήσεις.

Οι περαιτέρω μετρήσεις στην περίπτωση αυτή αχρείαστες αφού το διάλυμα με τον μικροοργανισμό BH2 στην συγκεκριμένη συγκέντρωση (200 mg/L) στις 200 ώρες όπου παρατηρείται η αύξηση στο control, μειώνεται και φτάνει σε συγκέντρωση ίση με 0 mg/L.

Στο διάγραμμα 4.7 παρουσιάζεται η καμπύλη συγκέντρωσης της νιτροφαινόλης σε συγκέντρωση 400 mg/L σε σχέση με τον χρόνο, όπως επίσης και το control σε συγκέντρωση 400 mg/L. Το διάλυμα της συγκέντρωσης της νιτροφαινόλης στα 400 mg/L, όπως και το control στα 400 mg/L, πραγματοποιήθηκαν σε pH 7 μετά από αραιώση 20 φορές.



Διάγραμμα 4.7: Καμπύλη συγκέντρωσης νιτροφαινόλης στα 400 mg/L σε σχέση με τον χρόνο.

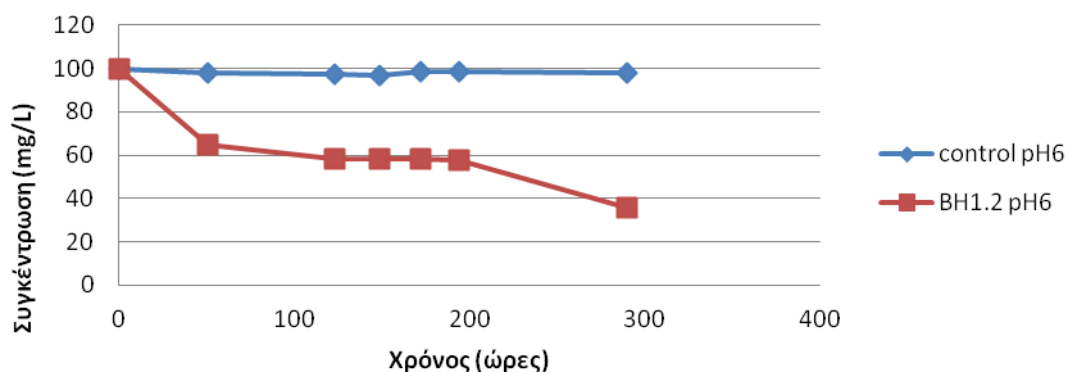
Στο διάγραμμα 4.7., παρατηρείται η μείωση της συγκέντρωσης της νιτροφαινόλης η οποία αρχίζει στις 74 ώρες. Το control αρχικά μειώνεται μέχρι τα 330 mg/L σε 100 ώρες ενώ στην συνέχεια σταθεροποιείται.

Στο διάλυμα με συγκέντρωση νιτροφαινόλης 400 mg/L, το οποίο έχει εμβολιαστεί με τον μικροοργανισμό BH2 παρατηρείται, από το διάγραμμα 4.7, μια συνεχής μείωση στην συγκέντρωση της νιτροφαινόλης μέχρι τις 380 ώρες όπου η συγκέντρωση της νιτροφαινόλης στο διάλυμα φτάνει στα 0 mg/L.

Η μείωση αυτή παρατηρείται από το χρώμα που παίρνει το διάλυμα σε όλο αυτό το χρονικό διάστημα, στην αρχή από κίτρινο που είναι το χρώμα της νιτροφαινόλης σε χρόνο 100 ώρες αλλάζει και γίνεται καφέ-κίτρινο, ενώ στο τέλος στις 380 ώρες όπου πάρθηκε και η τελευταία μέτρηση το διάλυμα παρατηρήθηκε ότι ήταν άχρωμο.

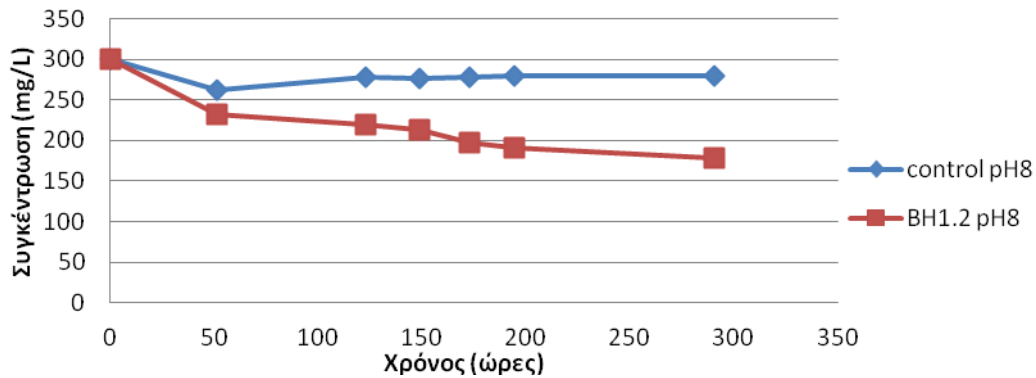
Αφού πάρθηκαν οι μετρήσεις των διαφορετικών συγκεντρώσεων της νιτροφαινόλης σε σχέση με τον χρόνο, ακολούθησε η περαιτέρω επεξεργασία της. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις νιτροφαινόλης, επεξεργάστηκαν σε pH διαφορετικό κάθε φορά με την χρήση του μικροοργανισμού BH2, ούτως ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες στις οποίες βιοαποικοδομείται η νιτροφαινόλη.

Πιο κάτω παρουσιάζονται το διάγραμμα 4.8, στο οποίο φαίνεται η καμπύλη συγκέντρωσης της νιτροφαινόλης στα 100 mg/L σε pH 6 και το διάγραμμα 4.9, στο οποίο φαίνεται η καμπύλη συγκέντρωσης της νιτροφαινόλης στα 300 mg/L σε pH 8. Προσπαθήσαμε να πάρουμε τις βέλτιστες συνθήκες για κάθε περίπτωση έτσι ώστε σε μια κανονική συγκέντρωση (100 mg/L) το pH να μην είναι εκτός της βιβλιογραφικής ανασκόπησης (pH 7-10). Στην συνέχεια για ένα πιο όξινο pH 8 προτιμήθηκε μία πιο μεγάλη συγκέντρωση νιτροφαινόλης (300 mg/L) για να παρατηρηθεί η αντίδραση του μικροοργανισμού σε πιο ακραίες συνθήκες.



Διάγραμμα 4.8: Καμπύλη συγκέντρωσης νιτροφαινόλης σε σχέση με τον χρόνο σε pH 6

Στο διάγραμμα 4.8 παρουσιάζεται η καμπύλη συγκέντρωσης της νιτροφαινόλης σε συγκέντρωση 100 mg/L σε σχέση με τον χρόνο, όπως επίσης και το control σε συγκέντρωση 100 mg/L. Τα πιο πάνω διαλύματα, πραγματοποιήθηκαν σε pH 6 μετά από αραιώση 10 φορές και κάτω από ασηπτικές συνθήκες όπως και σε όλα τα διαλύματα αυτής της εργασίας.



Διάγραμμα 4.9: Καμπύλη συγκέντρωσης νιτροφαινόλης σε σχέση με τον χρόνο σε pH 8

Στο διάγραμμα 4.9 παρουσιάζεται η καμπύλη συγκέντρωσης της νιτροφαινόλης σε συγκέντρωση 300 mg/L σε σχέση με τον χρόνο, όπως επίσης και το control σε συγκέντρωση 300 mg/L. Τα πιο πάνω διαλύματα, πραγματοποιήθηκαν σε pH 8 μετά από αραιώση 20 φορές. Από το διάγραμμα 4.9 παρατηρούμε ότι σε πιο ψηλές συγκεντρώσεις νιτροφαινόλης και σε πιο όξινο pH, η νιτροφαινόλη χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να βιοαποικοδομηθεί. Στην περίπτωση πιο πάνω όμως δεν μπόρεσε να ολοκληρωθεί η βιοαποικοδόμηση της λόγω έλλειψης διαλύματος.

Στην συνέχεια, για την ολοκλήρωση της εργασίας, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από δείγμα το οποίο ήταν εμβολιασμένο σε τρυβλίο από τον μικροοργανισμό BH2 και από δείγμα από διάλυμα υγρής καθαρής καλλιέργειας συγκέντρωσης 100 mg/L η οποία ήταν επίσης εμβολιασμένη με τον μικροοργανισμό BH2.

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση, η οποία ήταν επιτυχημένη και τα δείγματα στάλθηκαν για ταυτοποίηση και αναγνώριση του μικροοργανισμού. Στην συνέχεια, άρχισε να γίνεται περαιτέρω έρευνα του μικροοργανισμού BH2 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αλατότητας, με γλυκόζη, yeast και ασετικό οξύ αλλά λόγω έλλειψης χρόνου δεν ολοκληρώθηκε η έρευνα.

Στο μέλλον, θα ήταν σημαντικό η βιοαποικοδόμηση της νιτροφαινόλης να ερευνηθεί περισσότερο και να αναγνωριστούν τα ενδιάμεσα προϊόντα εφόσον κάποια από αυτά θα μπορούσαν να είναι σημαντικές βιομηχανικές χημικές ουσίες. Όπως επίσης, να συνεχιστεί η ερευνά που δεν ολοκληρώθηκε για να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες που χρειάζεται ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός για την βιοαποικοδόμηση της νιτροφαινόλης.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά την διάρκεια της εργαστηριακής εργασίας υπήρξαν πολλές ενδείξεις από διαφόρους μικροοργανισμούς ότι θα μπορούσαν να βιοαποικοδομήσουν την νιτροφαινόλη. Παρόλα αυτά κρίθηκε κατάλληλος για περαιτέρω επεξεργασία ένας συγκεκριμένος μικροοργανισμός από δείγμα που πάρθηκε από Βιομηχανία και ο οποίος ονομάστηκε BH2. Επιλέχθηκε ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός BH2 λόγω της αλλαγής του χρώματος που επέφερε στην νιτροφαινόλη, από κίτρινο σιγά σιγά με τον χρόνο το χρώμα της έγινε άχρωμο.

Από την διεκπεραίωση της εργασίας καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι σε ψηλές συγκεντρώσεις νιτροφαινόλης ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός χρειάζεται περισσότερο χρόνο για την βιοαποικοδόμηση της, ενώ σε πιο χαμηλές συγκεντρώσεις παρατηρείται βιοδιάσπαση της σε μικρότερο χρόνο. Το ίδιο ακριβώς παρατηρήθηκε και στην περίπτωση με το pH, σε αλκαλικά pH (pH 7-9) η βιοδιάσπαση της νιτροφαινόλης παρουσιάζεται στο μέγιστο, ενώ σε pH μεγαλύτερα του 10 και μικρότερα του 6, δεν παρατηρείται βιοδιάσπαση της νιτροφαινόλης.

Στην συνέχεια αυτής της εργασίας θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν άλλες πιο κατάλληλες μέθοδοι για την μελέτη του μικροοργανισμού και έτσι αναμένονται καλύτερα αποτελέσματα.

Στην περίπτωση της νιτροφαινόλης θα μπορούσαν να μελετηθούν περισσότερο οι μικροοργανισμοί που δεν προκάλεσαν αλλαγή στο χρώμα του βιομέσου και αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός βρισκόταν σε φάση επώασης ή ακόμα και στον συν-μεταβολισμό (ταυτόχρονη αποικοδόμηση δύο ενώσεων, στις οποίες η αποικοδόμηση της δεύτερης ένωσης (η δευτερεύουσα υπόστρωμα) εξαρτάται από την παρουσία της πρώτης ένωσης (το κύριο υπόστρωμα)). Για αυτό τον λόγο θα μπορούσε να γίνει δοκιμή βιοαποικοδόμησης του μικροοργανισμού και στη συνέχεια η ανάλυση και μέτρηση της βιοαποικοδόμησης της νιτροφαινόλης να γίνει με την χρήση κάποιας άλλης μεθόδου και όχι της Φασματοφωτομετρίας, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ίσως η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας. Επίσης θα μπορούσαν να γίνουν οι κατάλληλες αναλύσεις έτσι ώστε να βρεθούν τα ενδιάμεσα προϊόντα που έδειξε να υπάρχουν μετά την φασματοφωτομέτρηση των δειγμάτων. Αυτά τα προϊόντα θα μπορούσαν να δώσουν σημαντικές πληροφορίες για το μονοπάτι της βιοαποικοδόμησης της νιτροφαινόλης.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Furiel R., Moktar H. And Mathieu S. (2009). "*Variability of kinetic parameters due to biomass acclimation: Case of para-nitrophenol biodegradation*". Bioresource Technology. vol 100. pp.5021-5029.
2. Xinghui Q., Ping W., Haiyan Z., Mei Li. And Zhongcheng Yan. (2009). *Isolation and characterization of Arthrobacter sp. HY2 capable of degrading a high concentration of p-nitrophenol*. Bioresource Technology. vol. 100. p.p. 5243–5248.
3. Qiuzan Z., Xinghui Q., Mei L., Wenqin B. And Baotong Li. (2007). *Biodegradation of p-nitrophenol by methyl parathion-degrading Ochrobactrum sp. B2*. Int. B. & Biodegradation. vol. 59. p.p. 297–301.
4. Tomei M., Annesini M. and Bussoletti S. (2004). *4-nitrophenol biodegradation in a sequencing batch reactor: kinetic study and effect of filling time*. Water Research 38. Italy. p.p. 375-384.
5. Wikipedia, the free encyclopedia. Φαινόλη, Access: [14/11/2012] from <http://en.wikipedia.org/wiki>.
6. Amann, R.I. (1995). *In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes*. In: Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D., de Bruijn, F.J. (Eds.). Molecular Microbial Ecology Manual. Kluwer Academic Publications. London. pp. MEM-3.3.6/1–MEM-3.3.6/15.
7. Tomei M., Rossetti S. and Annesini M. (2006). *Microbial and kinetic characterization of pure and mixed cultures aerobically degrading 4-nitrophenol*. Technical Note. Chemosphere 63.Italy. p.p. 1801-1808.
8. Qiu X., Wu P., Zhang H., Li M. and Yan Z. (2009). *Isolation and characterization of Arthrobacter sp. HY2 capable of degrading a high concentration of p-nitrophenol*. Bioresource Technology. Vol 100. p.p. 5243-5248.
9. Qui X., Zhong Q., Li M., Bai W. and Li B. (2007). *Biodegradation of p-nitrophenol by methyl parathion-degrading Ochrobactrum sp. B2*. International Biodeterioration & Biodegradation. Vol 59. p.p. 297-301.
10. Yongliang Z., Deli L., Shiwang L., Shangying X., Yongze Y. and Li X. (2009). *Kinetics and mechanisms of p-nitrophenol biodegradation by Pseudomonas aeruginosa HS-D38*. Journal of Environmental Sciences 21. p.p. 1194-1199.

11. Yongliang Z., Deli L., Zhong Y., Hui X., Yongze Y., Li X. and Li W. (2009). *Biodegradation of p-nitrophenol by Pseudomonas aeruginosa HS-D38 and analysis of metabolites with HPLC-ESI/MS*. International Biodeterioration & Biodegradation vol 63. p.p. 1125-1129.
12. Αγγέλης Γ. (2007). Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία. Εκδόσεις Αθ. Σταμάτης.
13. Καραγιάννης-Κύρτσου Α.Δ.(1999). Μικροβιολογία Αθ. Σταμάτης.
14. Madigan M. T., Martinka J. M, and Parker J., (2005). Βιολογία των Μικροοργανισμών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης Vol 1.
15. Waksmundzka-Hajnos M. And Sherma J. (2011). *High Performance Liquid chromatography in Phytochemic Analysis*. Chromatographic Science series Vol 102.
16. Λοϊζίδου Μ. (2006). *Διενέργεια δειγματοληψιών, μετρήσεων και αναλύσεων σε ύδατα και υγρά απόβλητα*. ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ. ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ. ΜΟΝΑΔΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
17. Page, A. L. (1982). *Methods of soil analysis. part 2. chemical and microbiological properties*. American Society of Agronomy. Soil Science Society of America.
18. Tsai, Y. L., and Olson, B. H. (1991). *Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments*. Applied and Environmental Microbiology 57(4).1070-1074.
19. Aljanabi, S. M., and Martinez, I. (1997). *Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques*. Nucleic Acids Research, 25(22), 4692-4693.
20. Product information (2011)/ Lab Supplies Π.Γαλάνης & ΣΙΑ Ο.Ε/Biotium Glowing Products for Science
21. Κόκκινος Χρ. (2009). Φασματοφωτομετρία UV-Vis. Χημικό Εργαστήριο. Από: <http://chimikoergastirio.blogspot.com/2008/09/uv-vis.html>
22. Ιωάννης Βυρίδης. (2010). Εργαστηριακές σημειώσεις. Συστήματα και Τεχνικές Περιβαλλοντικής Παρακολούθησης.